Thermo SCIENTIFIC

Ver. 3.8 Users Manual

取扱説明書　　日本語版

本文中に記載されている情報は、あくまでも参考のためのものとなっております。本文に含まれるすべての情報は正確で完全なものであるように万全を期しております。本文中に含まれる誤り、および本機器の導入、操作もしくは使用に関連して起こる、偶発的もしくは必然的なダメージに関して Thermo Fisher Scientific は一切の責任を負いません。本文に記載された情報、および商品の仕様は、予告なしに変更される場合があります。

本文には、著作権もしくは商標によって保護されている情報および製品名の記述、またはそれらを参考とした表現の含まれる場合があります。また、本文書は弊社の所有する商標権もしくはその他の権利下のいかなるライセンスも譲渡するものではありません。第三者の商標もしくはその他の権利の侵害により発生する責任を弊社が負うことはありません。

弊社は本製品に関するいかなる種類の保証 (商品性および特定目的への適合性に関する黙示的な保証を含むがこれに限らず) も提供しておりません。最終的に、お客様が本システムのバリデーションの責任を負うこととなります。

© 2010 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
弊社の事前の許可なく、本文書のあらゆる箇所に関して、検索システムへの登録、転送、もしくはあらゆる手段での複製 (写真複写、写真撮影、磁気式またはその他の記録を含むがこれに限らず) を行うことはできません。

技術的なサポートに関しては、販売代理店までお問い合せください。

Microsoft、Windows、Windows NT および Excel は 米国 および/もしくは各国の Microsoft Corporation の商標または登録商標です。
Adobe および Acrobat は Adobe Systems, Incorporated の商標です。
その他のすべての商標は Thermo Fisher Scientific もしくはその子会社の所有となっております。

NanoDrop は Thermo Fisher Scientific の商標です。

20010 年 12 月 改訂

目次

1. 概要 1-1

本体特徴 1-1
操作 1-1
アプリケーション 1-1
特許 1-1

2. 設定 2-1

コンピューターの必要条件 2-1
ソフトウェアのインストール 2-1
ソフトウェアアップグレード 2-2
登録 2-2

3. 操作全般 3-1

サンプル保持システム 3-1
サンプル保持システムの使用後のクリーニング法 3-1
ソフトウェアの構成と機能 3-3
User Preference (初期設定画面) 3-4
Utilities and Diagnostics 3-5
Account Management 3-5
Dye/Chromophore Editor 3-7

4. 各測定モードに共通の機能 4-1

測定モードの起動 4-1
共通の機能 4-1
Measure (F1) 4-1
Blank (F3) 4-1
Reblank (F2) 4-2
Print Screen (F4) 4-2
Start Report / Recording (F6) 4-2
Print Report (F5) 4-3
Show Report (F7) 4-3
Sample ID 4-3
Exit (Escape) 4-3
Escape Key (ESC) 4-4
Show Context Help (Ctrl+H) 4-4
User's Manual 4-4

5. 核酸の測定モード 5-1

サンプルの必要量 5-1
測定濃度範囲 5-1
スペクトルのノーマライズ 5-2
Spectrum Overlay Control 5-2

6. マイクロアレイモード 6-1

蛍光 Dye の選択 6-1
サンプルの必要量 6-1
測定濃度の範囲 6-1
ベースラインの算定およびノーマライズ 6-2

7. UV-VIS 測定モード 7-1

サンプルの必要量 7-1
測定濃度の範囲 7-1
結果表示画面 7-1

8. Protein A280 測定モード 8-1

サンプルの必要量 8-1
タンパク測定後のクリーニング法 8-1
測定濃度の範囲 8-1
結果表示画面 8-2
スペクトルのノーマライズ 8-3
Spectrum Overlay Control 8-3

9. Proteins & Labels 測定モード 9-1

蛍光 Dye の選択 9-1
サンプルの必要量 9-1
タンパク測定後のクリーニング法 9-1
測定濃度の範囲 9-2
結果表示画面 9-2
ベースラインのタイプ 9-3

10. タンパク質 BCA 測定モード 10-1

サンプルの必要量 10-1
タンパク測定後のクリーニング法 10-1
測定濃度の範囲 10-1
BCA キット、プロトコル、およびサンプルの準備 10-1
結果表示画面 10-2
BCA 測定の操作 10-2
Standard Curve Features 10-3
Delete Standard Point 10-3
BCA 測定モードの終了 10-4

11. タンパク質 Lowry 測定モード 11-1

サンプルの必要量 11-1
タンパク測定後のクリーニング法 11-1
測定濃度の範囲 11-1
Lowry 改良法キット、プロトコル、およびサンプルの準備 11-1
結果表示画面 11-2
Lowry 測定の操作 11-2
Standard Curve Features 11-3
Delete Standard Point 11-3
Lowry 測定モードの終了 11-4

12. タンパク質 Bradford 測定モード 12-1

サンプルの必要量 12-1
タンパク測定後のクリーニング法 12-1
測定濃度の範囲 12-1
Bradford キット、プロトコル、およびサンプルの準備 12-2
結果表示画面 12-2
Bradford タンパク質測定の操作 12-2

Standard Curve Features 12-3
Delete Standard Point 12-4
Bradford モードの終了 12-4

13. Protein Pierce 660nm 測定モード 13-1

結果表示画面 13-1
Pierce 660 nm タンパク質測定の操作 13-2
Standard Curve Features 13-3
Delete Standard Point 13-3

14. セルカルチャー測定モード 14-1

サンプルの必要量 14-1
細胞懸濁液濃度 14-1
サンプルの均一性 14-2
測定面の汚染除去 14-2

15. 保存データと Data Viewer 15-1

アーカイブファイルの作成 15-1
データの保存階層 15-1
Data Viewer 15-2
Archive File Converter 15-7
表計算プログラムで保存ファイルを開く 15-7

16. お問い合わせ先 16-1

1. 概要

本体特徴

NanoDrop 1000 スペクトロフォトメーターはフルスペクトル (220～750 nm) 測定可能な分光光度計です。NanoDrop 1000 では表面張力を利用した新技術 (特許) を採用し、1 μL のサンプルで高精度な測定を行なえます。キュベットのコンタミによる濃度の誤差もありません。さらに、NanoDrop 1000 では高濃度サンプルも希釈せずに測定可能です(一般のキュベットを用いる方法に比べ、50 倍高濃度のものを測定可能です。)。

操作

測定するサンプルを直接ピペットで測定部表面に添加します。光ファイバー一端末間に溶液を円柱状に牽引形成することで、測定光路を確立します。光源側の光ファイバーがキセノンフラッシュランプに接続され、受光側の光ファイバーがリニア CCD アレイを利用した分光測定部に接続されています。本体はソフトウェアで制御され、データは PC のアーカイブファイルに書き込まれます。

アプリケーション

NanoDrop 1000 分光光度計を使用して 1 µL で測定しても、従来の UV/VIS 分光光度計と同じ結果を得ることが出来ます。NanoDrop 1000 を用いた微量サンプルでの測定は下記のような場合に最適です。

- DNA サンプルを希釈せずに測定 (上限: dsDNA で 3700 ng/µL)
- 蛍光色素でラベリングしたマイクロアレイサンプルの測定
- 蛍光標識されたタンパク質、化合物、および金属タンパク質の測定
- 精製タンパクの測定 (上限: BSA で 100 mg/ml)
- ブラッドフォード法によるタンパク質の濃度測定
- BCA 法によるタンパク質の濃度測定
- Lowry 法によるタンパク質の濃度測定
- Pierce Protein 660 nm Protein Assay によるタンパク質の濃度測定
- 細胞などの濁度測定
- 一般的な UV/VIS 分光光度計として

特許

NanoDrop 1000 に使用されているサンプル保持システムは US patent 6,608,.382 および 6,890,826 で保護されています。その他の特許についても申請中です。

2. 設定

コンピューターの必要条件
オペレーティングソフトウェアは以下の条件を満たした IBM 互換 PC でのみ動作します。マッキントッシュはご利用になれません。

- Microsoft Windows 2000、XP、Vista (32 bit)、Windows 7 Professional (32 bit および 64bit)
- 233 MHz またはそれ以上の周波数で作動するプロセッサ
- CD ROM ドライブ
- 32 bit システムの場合は 1 GB、64 bit システムの場合は 2 GB の RAM
- 40 MB 以上のハードディスク容量
- USB ポート (本体は USB ポート専用です)
- モニター解像度 1024 X 768 ピクセル以上

ソフトウェアのインストール
警告: USB ケーブルを用いて PC と接続する前に、システムソフトウェアをコンピューターにインストールする必要があります。

ソフトウェアを適切にインストールするため、以下の説明に従ってください。

1. すべてのソフトウェアを終了し、USB ケーブルを抜いて下さい。
2. ソフトウェア CD をコンピューターのドライブに挿入すると、自動的にインストール画面が立ち上がります。立ち上がらない場合は、マイコンピューターの中から、CD のアイコンを選択して ”nd-1000…install.exe” のフォルダをダブルクリックして下さい。
   ソフトウェア画面が立ち上がったら、”Install Software” を選択し、指示に従って下さい。
3. ソフトウェアのインストール後、本体の後ろに貼ってある Warning ラベルを剥がし、PC に USB ケーブルをつないで下さい。下記の Found New Hardware Wizard ダイアログが表示されます (Windows XP SP2 では下図のように適切なソフトウェアを参照するためのインターネット検索の実行について、尋ねられます。”No, not this time” を選択してください。)。プロンプトに従ってください。ソフトウェアのインストールが自動的に進行します。

Found New Hardware Wizard
Welcome to the Found New Hardware Wizard
Windows will search for current and updated software by looking on your computer, on the hardware installation CD, or on the Windows Update Web site (with your permission).
Read our privacy policy
Can Windows connect to Windows Update to search for software?
Yes, this time only
Yes, now and every time I connect a device
No, not this time
Click Next to continue.
< Back
Next >
Cancel
Intro Page: Windows XP- SP2

Found New Hardware Wizard
This wizard helps you install software for:
NanoDrop USB Device
If your hardware came with an installation CD or floppy disk, insert it now.
What do you want the wizard to do?
Install the software automatically (Recommended)
Install from a list or specific location (Advanced)
Click Next to continue.
< Back
Next >
Cancel
All Windows Operating Systems

4. 以上でインストールは終了です。ソフトが適切に起動しない場合は、トラブルシューティングを参照して下さい。

フォントの設定

ソフトウェアを最適な環境でお使いになるために、MS Sans Serif font の 8 ポイントにして下さい。

1. デスクトップで右クリックしプロパティを選択します。
2. “デザイン” タブを選び、”詳細” を押します。
3. “指定する部分” を ”アイコン設定” に変更し、上記のフォントを選択します。
4. “OK” をクリックして、終了します。

他のフォントでも使用できますが、画面内に文字が収まらない場合がございます。

ソフトウェアアップグレード

ソフトウェアは定期的にアップグレードされ、基本的に無料で提供されます。輸入元 (株式会社 スクラム) のホームページ、または弊社ウェブサイトよりダウンロードすることが出来ます。
www.scrum-net.co.jp もしくは、www.nanodrop.com

接続

本体とパソコンは USB ケーブルで接続できます。また電源は本体の背面に付属の電源アダプター (12 V) を接続します。

注意: 使用していない場合の待機電力は 1.5 W 以下です。本体に入切スイッチはありません。

登録

ユーザー登録にご協力下さい。今後 Thermo Fisher Scientific 社は、継続的にソフトウェアのバージョンアップを行っていく予定です。メールなどにて情報をお送りするので、納品時、製品についております保証書にご記入の上、必ず国内輸入元の (株) スクラムへ返送下さるようお願い致します。

3. 操作全般

サンプル保持システム

基本的な使用法

サンプル保持システムを使用するための主な手順を、以下に記載します。

1. 上部アームを上げて、サンプルを下部測定面にピペットで乗せます。

2. 上部アームを閉じ、パソコンのソフトウェアを使って、スペクトルの測定を開始します。上下の測定面間にサンプルの液柱が形成されスペクトルの測定が実行されます。

3. 測定が終わったら、上部アームを開けて、柔らかいラボペーパー (キムワイプなど) を使って、上下の測定面のサンプルをふき取ります。この簡単な拭き取り操作で、次の操作へのキャリーオーバーは 1/1000 以下になります。サンプルのキャリーオーバーに関する性能データについては、www.nanodrop.com を参照してください。

サンプル保持システムの使用後のクリーニング法

通常、各サンプル測定後に上下測定面を拭き取ることで、サンプルキャリーオーバーと残留物の定着を回避することができます。高濃度サンプル測定後は 2 µL の水で上下測定面をクリーニングする必要があります (通常の測定では不要)。多量のサンプルを測定した後は、上下測定面とその周囲を十分にクリーニングすることをお勧めします。これにより、サンプルの残余と低濃度測定への影響を回避します。最後の測定が終了したら、脱イオン水を含ませたラボペーパーで拭いた後、乾いたラボペーパーで良く拭いてください。
注意: 脱イオン水を滴下する際は、噴霧ボトルを使用しないでください。

測定面の汚染除去
汚染除去の必要な場合は、次亜塩素酸ナトリウムの 0.5 % 溶液 (市販の漂白剤を 1:10 希釈 – 使用の都度用意) 等の消毒液を使用し、上下測定面の生理活性物質を除去してください。測定面のオプティカル部分の金属は SUS303 ステンレス鋼を使用し、一般的なラボの薬品に対して耐性があります (付録「溶媒耐腐食性」を参照)。注意: 希釈漂白剤を滴下する際は、噴霧ボトルを使用しないでください。

測定面の状態改善
界面活性剤を含むバッファー (Bradford 試薬等) は測定面の状態を悪化させ、1 µL サンプルでの液柱形成を困難にする場合があります。測定面の状態が悪化した場合は、乾いたラボペーパーで 30～40 回上下測定面を強く拭くことにより、測定面の状態が改善され、液柱が形成されます。また、測定面改善の迅速な手段として、NanoDrop リコンディショニングキットを使用する方法もあります。PR-1 キットに関する詳細な情報については、www.nanodrop.com をご参照ください。

サンプルの推奨量
上下の測定面の間にサンプルの液柱が形成されることが必要であり、サンプル量が結果に影響することはありません。

サンプルの液柱形成を確実にするために、以下の量で測定することを推奨します。

- 核酸: 1 µl
- dye 結合溶液: 2 µl
- 精製タンパク質: 2 µl
- Bradford 法、または BCA 法溶液: 2 µl
- 濁度測定液: 2 µl

1～2 マイクロリットルの分注を確実に行なうには、極細チップのついた高精度ピペッター (0～2 マイクロリットル用) の利用が最適です。サンプルの特性、またはピペッターの精度が不明な場合のサンプル量は 2 µL が推奨されます。

サンプルのキャリーオーバー
NanoDrop 1000 分光光度計の 測定面へのサンプルの残留防止は容易に実行することができます。乾いたラボペーパーで上下測定面を拭くだけで、キャリーオーバーの防止には十分に効果があります (サンプルデータに関しては www.nanodrop.com をご覧ください)。上下測定面は光ファイバーケーブル (石英ガラス) を磨き上げた滑らかな面のため、サンプルが残るようなひびや隙間はありません。

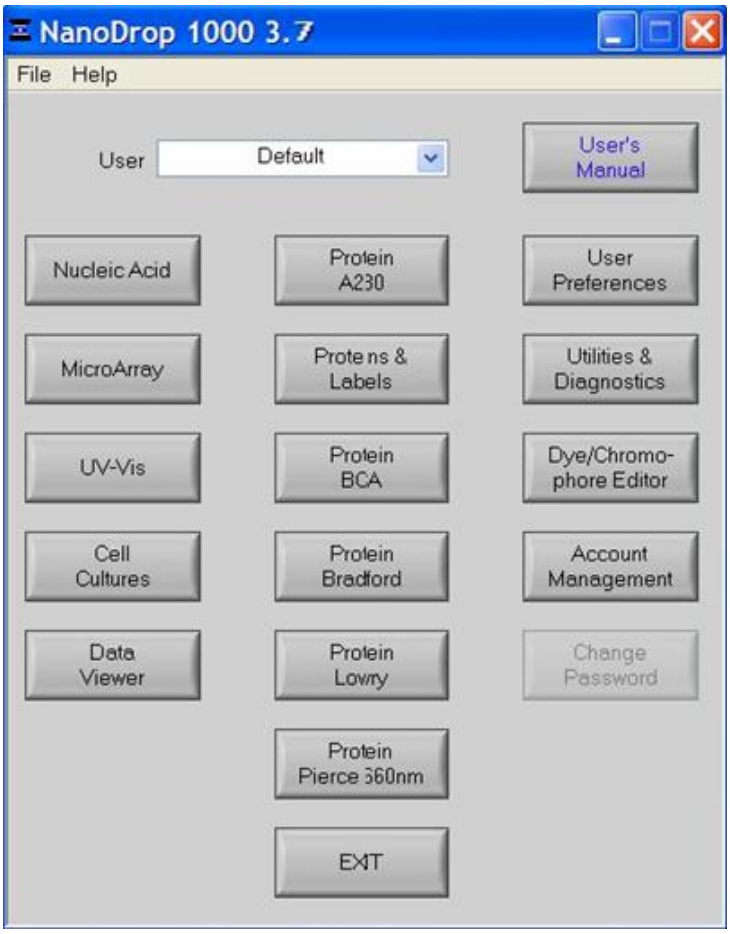
サンプルの均一性
均一性のない溶液からのサンプル採取は、殊に量が少ない時には、分光光度法等の様々な測定技術を利用して生成したデータに著しいばらつきを引き起こす可能性があります。ゲノム DNA やラムダ DNA、不均一な高濃度核酸の溶液が、分子生物学者には一般的な例として知られています。タンパク質は、変性、沈殿、そして凝結が起こりやすいので、サンプルの均一性を確保するためにも、取り扱いに注意が必要です。

蒸発による影響
測定中のサンプルの蒸発が、測定結果に与える影響は、サンプル濃度で 1～2% 増と考えられます。本現象は同じサンプルを実際連続して測定することで観察できます。サンプルを測定面に乗せた後、速やかに測定することをお奨めします。

サンプルの回収
サンプル保持システムの利点のひとつに、測定後、サンプルをそのままピペットで回収できることが挙げられます。

ソフトウェアの構成と機能

メインメニュー
上部アームをおろした状態で、下記のパスを選択して、NanoDrop ソフトウェアを起動します。
Start → Programs → NanoDrop → NanoDrop (Version)



アプリケーション (測定モード)
ソフトウェアは、研究者のニーズに合わせて設計されています。以下のアプリケーション (測定モード) が含まれています。

- Nucleic Acid Measurement ー 核酸の濃度と純度
- MicroArray ー dye 結合時の核酸の濃度と純度
- UV-Vis ー 一般的な UV-Vis の測定
- Protein A280 ー 精製タンパク質の濃度
- Proteins & Labels ー Dye 標識されたタンパク質や化合物、金属タンパク質の濃度
- Protein BCA ー BCA 法によるタンパク質濃度測定
- Protein Bradford ー Bradford 法によるタンパク質濃度測定

- Protein Lowry ー 改良 Lowry 法によるタンパク質濃度測定
- Cell Culture ー 濁度の吸光
- Pierce 660 nm Protein Assay – 660 nm Assay によるタンパク質濃度測定

User Preference (初期設定画面)
個々のユーザーは、各アプリケーション (測定モード) において、最もよく使う設定を予め選択しておくことができます。以下は、User Preference の各タブに共通する主要なオプションです。

- **Archiving**
  初期設定のデータ保存位置に加え、各データを任意の位置へ保存することができます。本オプションは Archving タブで選択することができます。Duplicate data storage のボックスを “On” にし、Duplicate Data Folder 下のファイルアイコンをクリックすることでファイルパスを選択してください。User Preference ウィンドウを終了する前に、Save Preference ボタンをクリックし、選択したパスを保存します。

- **Reports**
  ユーザーは ‘Auto Reporting’ オプションを選択することができます。Auto Reporting オプションではすべてのサンプルに関して、Report 形式でデータが自動的に作成されます。Reports タブの Auto Reporting の下に並んだ各アプリケーションの隣のボックスを選択することで、本オプションを選択することができます。User Preference ウィンドウを終了する前に、Save & Exit ボタンをクリックし、設定を保存します。

  注意: User Preference は ”.log” ファイルに保存されます。新規ソフトウェアへのアップグレード行う際には、.log ファイルを保護しなくてはなりません。新規ソフトウェアのアップグレード後、User Preference が正常に機能しない場合は、”.log” ファイルを適切なディレクトリへコピーします。詳細については ”Password.log” セクションを参照してください。

- **Nucleic Acid**
  デフォルトの設定は DNA-50 です。その他の設定に RNA-40、ssDNA-33、および任意の定数を設定する Other があります。

- **UV-Vis**
  特定波長をモニターする 2 つのカーソルの初期設定は、λ1 は 300 nm、λ2 は 700 nm となっています。HiAbs (0.2 mm 光路長を自動的に有効にする。) を有効にすることが可能です。また、オプションとして、400 nm から 700 nm の波長で最も低い吸光度を使用して、データとスペクトルをノーマライズすることも可能です。

- **Microarray**
  核酸についてのデフォルトの設定は ssDNA-33 です。納品時のデフォルト設定では、Dye 1 は Cye3 になっています (750 nm での吸光度でノーマライズ)。

  その他のオプションとして、RNA-40、ssDNA-33、Alexa Fluor Dye 等のいくつかの選択色素を含む Other があります。カスタム dye と chromophore の追加についての詳細は、本セクション後述の “Dye/Chromophore Editor” をご覧ください。

- **A280**
  精製タンパク分析と濃度検出については 6 つのサンプルタイプ (選択) を用意しています。デフォルトの設定は Other (E1%) となっています。各サンプルタイプの詳細については、セクション 8

をご覧ください。注意: ver. 3.5.1 以降のソフトウェアには、「340 nm の吸光度でのデータとスペクトルのノーマライズ」の有無を選択する機能が備えられています。

- **Proteins and Labels**
  精製タンパク分析と濃度検出については 6 つのサンプルタイプ (選択) を用意しています。デフォルトの設定は Other (E1%) となっています。

  340 nm の吸光度でのデータとスペクトルのノーマライズの有無を選択することもできます。また、納品時のデフォルト設定では、Dye 1 は Cye3 になっています (750 nm での吸光度で ノーマライズ)。

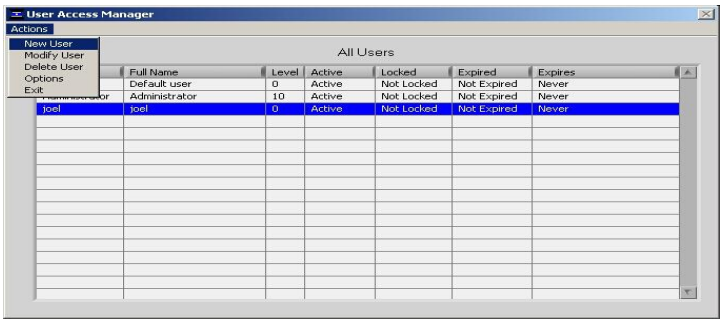
Utilities and Diagnostics
本モードは本体がキャリブレーションした光路長の範囲で動作しているか確認する際、および本体のトラブルを検査する際に使用します。注意: ver. 3.5.1 以降のソフトウェアには、キャリブレーションチェック機能が備えられています。

詳細については、ショートマニュアルの”キャリブレーションチェック”、および “トラブルシューティング” を参照してください。

Account Management
Account Management モードでは、特定のデータファイルの保存場所を指示したり、各ユーザーにデータの個人ファイルへの分離を許可したりできます。
Account Management モードにアクセスできるのは、Administrator のみです。

アカウントのタイプ
ユーザーアカウントには、3 種類あります。

- **Level 10** - 最上位のセキュリティセッティングです。すべての level 10 ユーザーは新規ユーザーの追加、ユーザーの修正、ユーザーの削除、およびパスワードの設定を行うことができます。ソフトウェアインストール時、唯一の level 10 ユーザーは Administrator で、パスワードは “nanodrop” となっています。初期のアカウント設定後、このパスワードは変更してください。すべてのユーザーを level 10 に設定することができますが、推奨しません (下記の level 5 をご覧ください。)。注意: Administrator (レベル 10 ユーザー) アカウントは消去できません。



- **Level 5** - 一般ユーザー向けのセキュリティレベルです。Level 5 アクセス権を有するアカウントはパスワードで保護され、特定の User Preference を選択することができます。また、生成されたす

べてのデータは自動的に *c: \nanodrop data* フォルダの各ユーザーのアカウント (環境設定で選択されている場合は、ユーザー任意の保存位置にも) に保存されます。

- **Default** (Level 0 セキュリティ) - 本アクセスレベルはデフォルトアカウントのためだけに設定されています。本アカウントはアカウントを持たないすべてのユーザーに、ソフトウェアの全測定モードにアクセスすることを可能にします。パスワードによる保護はありませんが、User Preference を設定することはできます。生成したすべてのデータは自動的に *c: \nanodrop data* フォルダの Default フォルダに保存されます。注意:各ユーザーが固有のユーザーアカウント有する場合、Administrator は Default ユーザーを削除することができます。

アカウントのログイン/ログアウトおよびタイムアウト

ユーザーアカウントは以下のいずれかの動作が行われるまで、有効となります。

1. メインメニューのプルダウンボックスで Default もしくは他のユーザーネームを選択し、ログアウトする。
2. ソフトウェアを終了する。

またユーザーアカウントは、ソフトウェアの ”System idle timeout” の制限時間を超えると、自動的にログオフされます。4 時間ソフトウェアを使用せず放置すると、自動的に Default ユーザーに戻ります。制限時間に近づくと、警告と 30 秒のカウントダウンが表示されます。ユーザーが “Cancel” を選択した場合、ふたたびユーザーアカウントと測定モードが 4 時間有効になります。制限時間を超えると、開いていた測定モードが終了され、メインメニューおよび Default ユーザーに戻ります。

アカウントのロックアウト

ユーザー固有のアカウントは、以下の場合にロックアウトになる可能性があります。

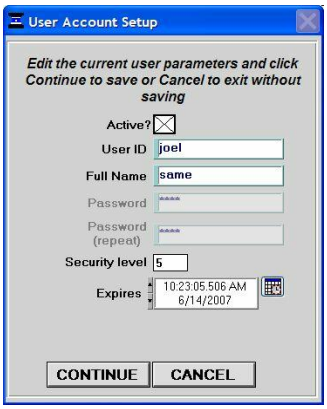
- 割り当てられた日数内にパスワードを変更しなかった。
- 連続して 99 回間違ったパスワードを入力した。
- Administrator (管理者) が特定のアカウントをロックした。

Administrator (*レベル 10) に限り、Account Management (アカウントの管理) の ”Modify User (ユーザーの変更)” 入力を使って、ロックされたアカウントのロックを解除できます。注意: すべてのアカウントは (たとえ Administrator であっても)、間違ったパスワード入力がなされれば、ロックされる可能性があります。

Change Passwoed

“Change password” でユーザーは各自のパスワードを変更できるようになります。

注意: Administrator (管理者) は、‘Account Management’ の ‘Options’ もしくは ‘Modify User’ 入力を使用して、パスワードに期限を設けるかどうかを設定します。設定する場合は、期限を日数で設定します。



Password.log ファイル

C: \NanoDrop Data \Log Files ディレクトリ内にある、本ファイルにはすべてのアカウントユーザー ID とパスワードが含まれています。Administrator は、新規ユーザーのアカウントが追加される都度、本ファイルのコピーを作り、同じフォルダに保存することを強く推奨します。 Administrator のアカウントがロック状態になったら、password.log の最新コピーをリネームして、password.log ファイルとして使用することが可能です。

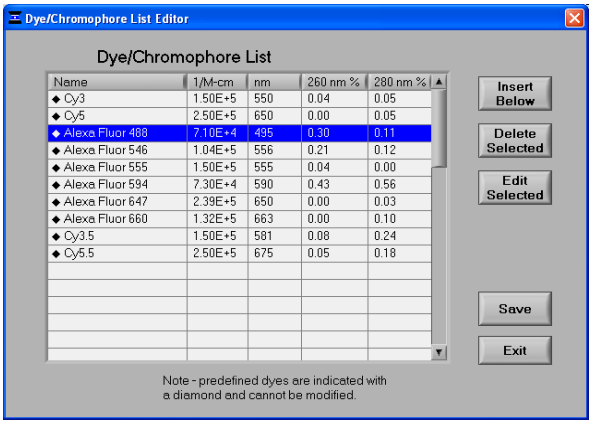
注意： 旧バージョンのソフトウェアからアップグレードする際、”passwords.log” および “user preference.log” ファイルは、*c: \NanoDrop Data \Log Files* ディレクトリに自動的にコピーされます。なんらかの原因により、自動コピーが実行されない場合は、これらのファイルを *c: \program files \NanoDrop (version) から c: \program files \NanoDrop （version）*ディレクトリへ、マニュアルでコピーしてください。

Dye/Chromophore Editor

メインメニュー上の Dye/Chromophore Editor ボタンを選択すると、初期設定済の蛍光 dye に加え、MicroArray、Proteins and Labels 測定モードで、ユーザー独自の dye もしくは chromophore を設定し、使用することができます。注意 1： 初期設定のメソッドは菱形で示され、編集することは出来ません。

注意 2 : 260 nm および 280 nm での各 dye からの Absorbance contribution は % のフィールドに適切な調整値を入力することにより、調整されます。Dye/Chromophore リストにあらかじめ設定されていない dye の 260 nm % および 280 nm % 係数については、Dye のメーカーにお問い合わせください。

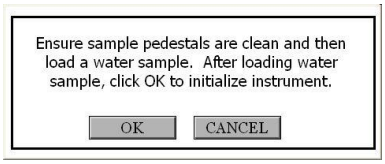
注意: Ver. 3.3 以前のソフトウェアからアップグレードした場合、ユーザーの設定した dye に 260 nm % および 280 nm % 調整値のゼロ (0) が入力されます。


Dye/Chromophore List Editor
Dye/Chromophore List
Name
1/M-cm
nm
260 nm %
280 nm %
Cy3 1.50E+5 550 0.04 0.05
Cy5 2.50E+5 650 0.00 0.05
Alexa Fluor 488 7.10E+4 495 0.30 0.11
Alexa Fluor 546 1.04E+5 556 0.21 0.12
Alexa Fluor 555 1.50E+5 555 0.04 0.00
Alexa Fluor 594 7.30E+4 590 0.43 0.56
Alexa Fluor 647 2.39E+5 650 0.00 0.03
Alexa Fluor 660 1.32E+5 663 0.00 0.10
Cy3.5 1.50E+5 581 0.08 0.24
Cy5.5 2.50E+5 675 0.05 0.18
Insert Below
Delete Selected
Edit Selected
Save
Exit
Note - predefined dyes are indicated with a diamond and cannot be modified.

4. 各測定モードに共通の機能

測定モードの起動

ソフトウェアが起動すると、下記のメッセージが表示されます。



最良の結果を出すために、下部測定部に dH_2O を乗せて 'OK' をクリックします。OK をクリック後、メッセージ **"Initializing Spectrometer- please wait (分光光度計の初期化中です。しばらくお待ちください。)"** が表示されます。メッセージが消えたら、測定可能です。測定データは、すべて適切な保存ファイルに自動的に記録されます。

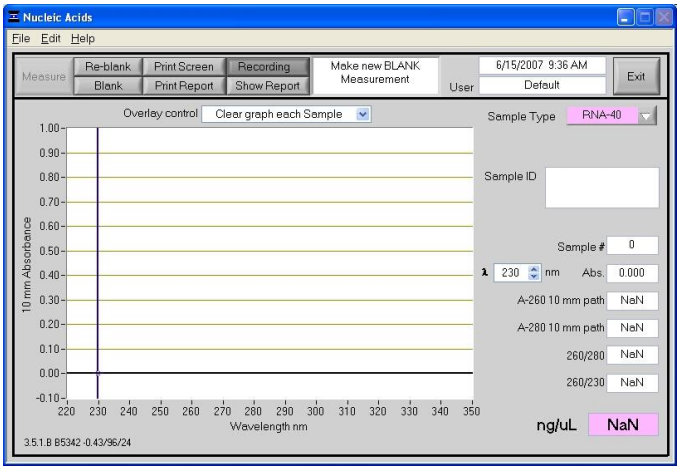
共通の機能

Measure (F1)

Measure ボタンをアクティブにするには、まず Blank の操作をし、次に 'Measure' ボタンのクリック、もしくは F1 キーの入力でサンプルの測定を実行します。測定サイクルは、全体で約 10 秒かかります。

Blank (F3)

サンプルの測定を実行する前に、Blank の測定を行なう必要があります (吸光度の算定について詳しくは、付録 "ブランキングおよび吸光度の算定" を参照)。初期ブランク測定の実行直後、既存のサンプルスペクトルは消去され、初期ブランクが保存されたことを示す直線が画面に表示されます。



最適な結果を得るために、一連の測定を実行する前に Blank を測定してください。Blank の測定により、本体が正常に機能していることと、測定面に汚れが付着していないことが確認できます。以下を参考に Blank を測定してください。

1. Blank サンプル (測定に使用するバッファー、溶媒等) を下部測定面に乗せ、上部アームを閉じてください。
2. 'Blank' (F3) ボタンをクリックします。
3. 測定が終了したら、ラボペーパーで上下測定面からサンプルを拭き取ってください。
4. 新しい Blank サンプルを乗せて、'Measure' ボタンを使用して測定します。スペクトルは比較的平坦なベースラインとなるはずです。上下測定面からサンプルを拭き取り、平坦なスペクトルが得られるまで、測定を繰り返してください。

吸光度の算定についての詳細は、付録 "ブランキングおよび吸光度の算定" を参照してください。

Reblank (F2)
Reblank (F2) では、次に行うサンプルの吸光度算定に使用する新しいブランクが設定されます。ただし、Blank (F3) 機能とは異なり、Re-blank 機能では、最新のサンプルの吸光度スペクトルが再計算され、画面に表示されます。Re-blank 機能を使用すると、以下のメッセージが表示されます。

吸光度の算定について詳しくは、付録「ブランキングおよび吸光度の算定」を参照。

Print Screen (F4)
"Print Screen" ボタンでは、パソコンに接続されているデフォルトのプリンターに、現在の画面がプリントされます。

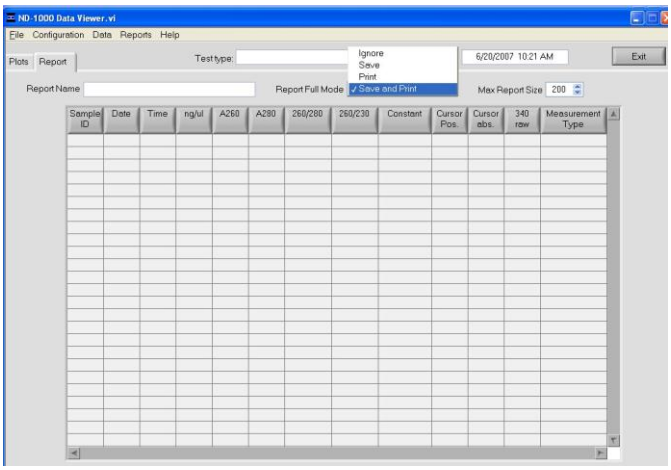
注意: システム設定では、#30256 [2-5/16 "X 4"] のシッピングラベルに Dymo Labelwriter 400 からプリントするようになっていますが、パソコンに接続された任意のプリンターでプリント可能です。

Print Window (Ctrl+P)
Print ダイアログは "File" プルダウンメニュー、もしくは 'Ctrl;P' で開始することができます。Print ダイアログから接続された任意のプリンターに印刷を指示できます。

.JPG イメージでの画面の保存
File プルダウンメニューから "Save Window" を選択すると、現在の画面を .jpg イメージで保存することができます。

Start Report / Recording (F6)
測定結果を記録および印刷することができます。本機能を開始するには、"Start Report" ボタンを押します。初期設定では Recording 機能はオンになっています。詳細については、セクション 15 の "Data Viewer" をご覧下さい。注意: 本機能を無効とするには、'Recording' ボタンを押してください。ボタン表記が 'Start Report'に変化します。

レポートの最大エントリー数に達したら、 'Ignore'、'Save'、'Print'、'Save and Print' の 4 つの選択肢から 1 つを選びます。



すべてのデータは *c:\NanoDrop Data* のアーカイブファイル (もしくは User Preferences で設定した任意の保存位置) に保存されます。
注意: デフォルトモードで、本機能を 'Recording' とすることも出来ます。詳細については、セクション 3 の "User Preferences" をご覧下さい。

Print Report (F5)
"Print Report" (F5) ボタンを選択すると、既存の "Sample Report" がプリントアウトされます。印刷と同時に、"Sample Report" の内容が消去されるよう設定することもできます。バッファの管理方法について、オプションを選択することも出来ます。詳細については、セクション 14 の "Data Viewer" を参照してください。すべてのデータは *c:\NanoDrop Data* のアーカイブファイルおよび User Preference で設定した任意の保存位置に保存されます。

注意: システム設定では、#30256 [2-5/16 "X 4"] のシッピングラベルに Dymo Labelwriter 400 からプリントするようになっていますが、パソコンに接続された任意のプリンターでプリント可能です。

Show Report (F7)
ユーザーは、'Show Report' ボタンを選択して、現在の 'Sample Report' を構成するエントリーを表示することができます。本機能では、セクション 14 で記述されている Data Viewer ソフトウェアを使用することが出来ます。個々の測定モードに固有の記述パラメータは、対応する各サンプル ID に入力されます。

Sample ID
ユーザーは、印刷データおよびアーカイブファイル中のサンプルを識別する目的で、'Sample ID' を入力することができます。サンプル ID は測定後に入力することは出来ません。

Sample #
"Sample #" は "Sample Report" の記録中に測定したサンプル数を示します。'Sample Report' が完全に一杯になるまで、連続して番号が増加します。サンプルバッファの上限は Report ページで調整できます。

Exit (Escape)
すべての測定モードとサポートしているオプションを閉じるコマンドです。

Escape Key (ESC)
“ESC” キーで全てのスクリーンを終了することができます。”ESC” キーを 2 回押すことで、アプリケーションを終了することが来ます。

Show Context Help (Ctrl+H)
‘Context Help’ は、メインメニュー、すべてのファンクション、そして測定モードで利用できます。ヘルプ機能は、”Help” メニューから ”Show Context Help (コンテキスト･ヘルプの表示)” を選択するか、または ”Cntrl + H” を入力すると開きます。Context Help を有効にすると、画面の要素上にカーソルを置くことで、その要素の説明が自動的に出てきます。‘Context Help’ は、ユーザーが選択を解除するまで、動作を続けます。

User’s Manual
すべての測定モードおよびメインメニューから、PDF 版の取扱説明書にアクセスすることができます。メインメニュー上の ”User’s Manual” ボタンのくリック、各測定モードの Help プルダウンメニューからの選択、もしくは *Start→Programs→NanoDrop→ND-1000 (Version Number)* で取扱説明書を開くことができます。

5. 核酸の測定モード

メインメニューより ‘Nucleic Acid Measurement’ ボタンを選択します。
NanoDrop 1000 分光光度計を使って、核酸サンプルの濃度や純度が容易に確認できます。

サンプルの必要量

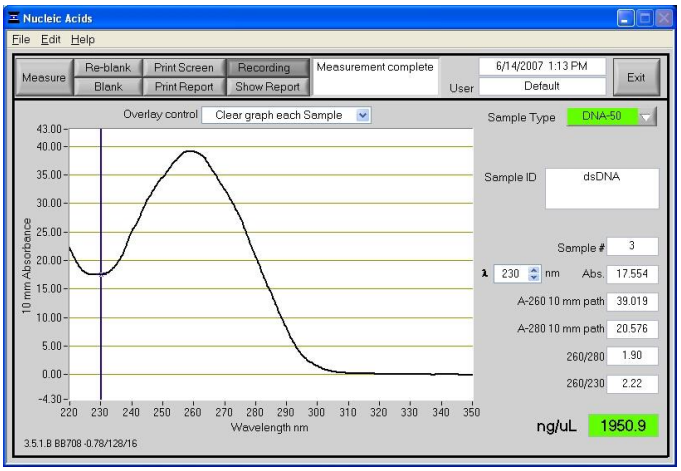
核酸サンプルを測定する時に、確実にサンプル液柱を形成するには、1 µL のサンプルで十分であることが分かっています。ただし、ピペッターの精度やサンプルの特性によって、1.5-2 µL のサンプルが必要となる場合もあります。

測定濃度範囲

NanoDrop 1000 分光光度計では、核酸サンプルを最大 3700 ng/µL まで希釈しないで正確に測定します。本体が自動で高濃度を検知して、1 mm から 0.2 mm の光路長に変えて吸光度を測定します。

およその 検出限界 (下限値) (ng/µL)	およその 検出限界 (上限値) (ng/µL)	測定の繰り返し精度 (n≧5 , SD: ng/µL , CV: %)
2	3700 (dsDNA) 3000 (RNA) 2400 (ssDNA)	サンプル範囲 2-100 ng/µL: ± 2 ng/µL サンプル範囲 >100 ng/µL: ± 2%

結果表示画面



Sample Type: 測定する核酸の種類によって色分けされています。ユーザーは、dsDNA 用の “DNA-50”、RNA 用の “RNA-40”、一本鎖 DNA 用の “ssDNA-33” 、あるいは他の核酸用の “Other” を選択することができます。デフォルトの設定は、DNA-50 です。”Other” を選択する場合、ユーザーは 15-150 間の吸光係数を選択できます。算定について、詳しくは付録「濃度の算出 (ベールの法則)」を参照してください。

λ と Abs: ユーザーが選択する波長と対応する吸光度です。波長は、カーソルのドラッグ、もしくは隣の上下矢印の使用により、選択できます。
注意: ユーザー任意の波長および吸光度を使用しての算出は出来ません。

A260 10 mm path: 260 nm におけるサンプルの吸光度 (10 mm の光路長に換算して表示) です。
注意: 本数値は、1 mm 光路長を用いた実測吸光度の 10 倍、および 0.2 mm 光路長を用いた実測吸光度の 50 倍となります。

A280 10 mm path: 280 nm におけるサンプルの吸光度 (10mm の光路長に換算して表示) です。
注意: 本数値は、1 mm 光路長を用いた実測吸光度の 10 倍、および 0.2 mm 光路長を用いた実測吸光度の 50 倍となります。

260/280: 260 nm と 280 nm におけるサンプルの吸光度比です。本数値は DNA と RNA の純度を表します。DNA では吸光度比 1.8 付近、また RNA では 2.0 付近を高純度とみなします。どちらの場合も、比率が低いと認められる場合、タンパク質、フェノール、または 280 nm 付近で強く吸収される他の不純物がある可能性を示します。本比率に影響を及ぼす可能性のある要素について、詳しくはトラブルシューティング・セクションの「260/280 吸光度比」を参照してください。

260/230: 260 nm と 230 nm におけるサンプルの吸光度比です。本値は核酸純度の補足的な測定値です。高純度な核酸の 260/230 の値は、多くの場合それぞれ 260/280 の値を上回り、通常 1.8～2.2 の範囲にあります。比率が範囲外の場合には、不純物がある可能性を示します。

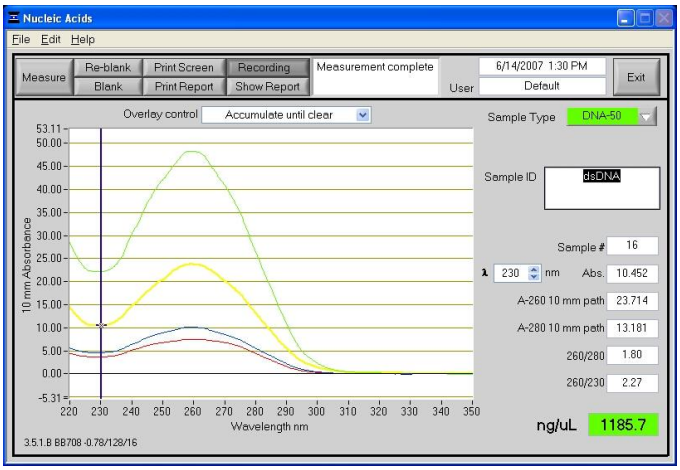
ng/µL: 算出されたサンプル濃度 (260 nm をベースラインとした吸光度、および選択した分析定数より算出しています) です。

スペクトルのノーマライズ

ほとんどゼロの吸光度となる 340 nm での吸光度に、ベースラインが自動的に設定されます。あらゆるスペクトルが、このゼロを基準としています。

Spectrum Overlay Control

本機能を使用することにより、同一画面上に複数のスペクトルを表示することができます。最新のサンプルプロットは太線で、それ以前のプロットは異なる色で表示されます。下図をご覧ください。



デフォルトオプションでは測定ごとに画面がクリアされるように設定されております。Overlay Control では、デフォルト設定に加え、レポートごとの消去、もしくはユーザーが消去するまでのスペクトルの重ね書きができます。Clear Now に設定すれば、すべてのプロットを消去します。Overlay ファンクションが機能している場合、核酸、およびタンパク質 A280 測定モードは 260 nm での吸光度に合わせて、y 軸を自動的に割り

出します。注意: Overlay ファンクションが機能していると、”Blank” を取り直しても、既存のサンプルスペクトルは消去されません。

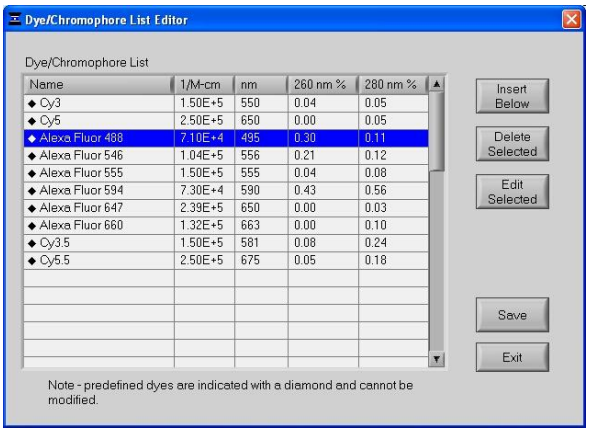
6. マイクロアレイモード

DNA マイクロアレイで使われる蛍光標識されたプローブを測定することにより、標識効率をかんたんに測定することが出来ます。本測定モードでは、DNA 濃度と色素ラベリング効率の測定が容易に行なえます。また約 1 µL 当たり 0.2 pmol の色素濃度での検出が可能です。

蛍光 Dye の選択

現在、マイクロアレイ測定モードで使用可能な蛍光 Dye は 9 種あります。メインメニュー上の “Dye/Chromophore Editor” を使用すると、プログラム済の Dye に加えて、ユーザー任意の蛍光 Dye を入力・保存することも出来ます。Dye の選択は、スクロール矢印を使用する、もしくは Dye 1 か Dye 2 をハイライトすることによって、実行されます。各吸光波長、吸光係数、および 260 nm と 280 nm の % 修正値が、測定および濃度の算出に自動的に使用されます。デフォルト設定では、Dye 1 を Cy3 に、Dye 2 を Cy5 に設定しています。 ドロップダウンメニューから選択できる蛍光 Dye に加えて、’None’ のオプションを選択することも可能です。’None’ を選択すると、Dye は選択されません。

注意: dye の製造元に確認して、適切な修正値を入力してください。



サンプルの必要量

Dye 結合核酸サンプルを測定する時に、確実にサンプル液柱を形成するには、1 µL のサンプルで十分であることが分かっています。ただし、ピペッターの精度やサンプルの特性によって、1.5-2 µL のサンプルが必要となる場合もあります。

測定濃度の範囲

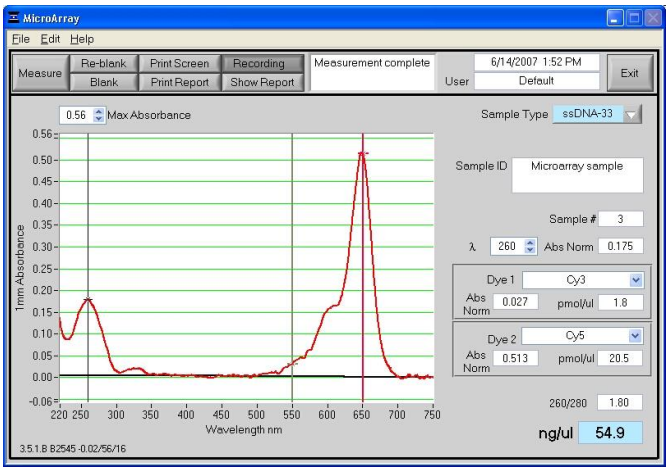
NanoDrop 1000 分光光度計では、蛍光色素や核酸の濃度をそれぞれ最大 100 pmols/µL (Cy3) と 750 ng/µL (DNA) まで、希釈しないで測定出来ます。サンプル濃度の範囲を以下の表に示します。

	およその 検出限界 (下限値) (pmol/µL)	**およその 検出限界 (上限値) (pmol/µL)**	**測定の繰り返し精度 (n≧5 , SD: pmol/µL, CV: %)**
Cy3, Cy3.5, Alexa Fluor 555 および Alexa Fluor 660	0.20	100	サンプル範囲 0.20-4.0 pmol/µL: ± 0.20 pmol/µL サンプル範囲 >4.0 pmol/µL: ± 2%

Cy5, Cy5.5 and Alexa Fluor 647	0.12	60	サンプル範囲 0.12-2.4 pmol/µL: ± 0.12 pmol/µL サンプル範囲 >2.4 pmol/µL: ± 2%
Alexa Fluor 488 および Alexa Fluor 594	0.40	215	サンプル範囲 0.40-8.0 pmol/µL: ± 0.40 pmol/µL サンプル範囲 >8.0 pmol/µL: ± 2%
Alexa Fluor 546	0.30	145	サンプル範囲 0.30-6.0 pmol/µL: ± 0.30 pmol/µL サンプル範囲 >6.0 pmol/µL: ± 2%

ベースラインの算定およびノーマライズ
ソフトウェアは、すべての検出データに関して、ビジュアルスペクトルの表示を 750 nm でノーマライズし、自動的に 400～750 間でベースラインを算定します。緑の垂直線は Dye 1 のピーク波長の位置を示し、赤い垂直線は Dye 2 のピーク波長位置を示します。

結果表示画面



Max Absorbance: 縦軸の上限を変更する時に使用します。

Sample Type: 測定する核酸の種類によって色分けされています。ユーザーは、dsDNA 用の “DNA-50”、RNA 用の “RNA-40”、一本鎖 DNA 用の “ssDNA-33” 、あるいは他の核酸用の “Other” を選択することができます。デフォルトの設定は、DNA-50 です。”Other” を選択した場合、ユーザーは 15-150 間の吸光係数を選択できます。算定について、詳しくは付録 “濃度の算出 (ベールの法則)”を参照してください。

λ と Abs Norm: ユーザーが選択する波長 (黒いカーソル) と対応する吸光度 (1 mm 光路長相当) です。波長は、カーソルのドラッグ、もしくは隣の上下矢印の使用により、選択できます。
注意: ユーザー任意の波長および吸光度を使用しての算出は出来ません。

Dye 1 (もしくは 2): 測定する Dye です。
Abs. Norm: 1 mm 光路長での Dye のノーマライズされた吸光度です。
pmol/µL Dye 1: Dye の吸光係数に基づく濃度です。算定について、詳しくは付録 “濃度の算出 (ベールの法則)” を参照してください。

ng/µL: 260 nm での吸光度から 340 nm での吸光度を引いた値 (要は 340 nm でのノーマライズ) と、核酸分析定数を使用して算出した核酸濃度です。詳しくは付録 “濃度の算出 (ベールの法則)” を参照してください。

260/280: 260 nm と280 nmにおけるサンプルの吸光度比です。本数値は DNA と RNA の純度を表します。DNA では吸光度比 1.8 付近、また RNA では、2.0 付近を高純度とみなします。どちらの場合も、この比率が低いと認められる場合、タンパク質、フェノール、または 280 nm 付近で強く吸収される他の不純物があることの可能性を示します。この比率に影響を及ぼす可能性のある要素について、詳しくはトラブルシューティング・セクションの “260/280 吸光度比” を参照してください。

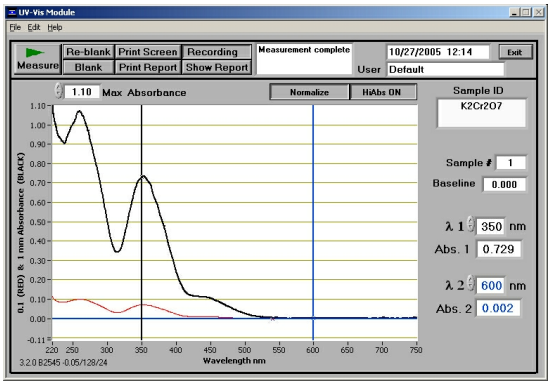
7. UV-VIS 測定モード

'UV/VIS Absorbance' モードでは、NanoDrop 1000 分光光度計を、220 nm～750 nm の全波長間での分光光度計として利用できます。画面に表示されるサンプルの吸光度は、カーソルで個々のピーク値が測定できます。

サンプルの必要量
サンプルを測定する時に、確実なサンプル液柱を形成するには、1 µL のサンプルで十分であることが分かっています。ただし、ピペッターの精度やサンプルの特性によって、1.5-2 µL のサンプルが必要となる場合もあります。

測定濃度の範囲
NanoDrop 1000 分光光度計では、10 mm 光路長換算で 75 Abs. (75 O.D) 相当の吸光度まで測定できます。ただし、本体のシリアル番号が 500 番以下のものでは、改良を加えない限り最大吸光度 15 Abs (15 O.D.) です。

結果表示画面



λ1/Abs1 と λ2/Abs2: ユーザーが選択する波長と対応する吸光度です。波長は、カーソルのドラッグ、隣の上下矢印の使用、もしくは波長の直接入力により、選択できます。

Baseline: ベースラインの吸光度を示し、ユーザーが任意に動かすことができます。
Max Absorbance: 本数値を考慮して、縦軸の最大吸光度を設定できます。

Hi Abs: 高濃度 (光路長 10 mm で 75 OD 相当まで) のサンプルが直接測定できます。本機能は、ヘッダーバーの "Hi Abs" ボタンを選ぶと、選択されます。選択されると、吸光度は短光路長 (0.2 mm) を使って測定され、表示例のように赤線でプロットされます。Sample ID に入力した情報は、サンプルのデータと共にファイルフォルダー *"C: \NanoDrop Data \Username \UV-Vis HiAbs"* に保存されます。得られたデータは DataViewer にインポートすることができませんが、Excel 等の表計算ソフトで開くことができます。User Preference モードで、本機能をデフォルトとして設定することもできます。

Normalize: UV/Vis モードではユーザーによる選択が可能です。選択すると、ソフトウェアが自動的に 400 nm～700 nm の範囲で、吸光度の最小値を基準にスペクトルをノーマライズします。User Preference モードで、本機能をデフォルトに設定することもできます。

8. Protein A280 測定モード

タンパク質は、核酸とは異なり、著しい多様性を示します。紫外吸光法 (A280 法) は、精製されたタンパク質に適用され、280 nm における吸光度を示します。検量線の作成は必要なく、そのままタンパク質サンプル濃度の測定ができます。このモードでは、220～350 nm の UV スペクトルが表示され、280 nm (A280) におけるタンパク質の吸光度と濃度 (mg/ml) が表示されます。核酸モードのように、高濃度のタンパク質では 0.2mm の光路長に自動的に切り替わります。また核酸モードと同じように、タンパク質 A280 モードは、画面や保存データファイルに 10 mm (1 cm) 相当のデータを表示し保存します。

サンプルの必要量

タンパク質の中には、疎水性のものもあれば、また親水性ものもあり、測定されるサンプルによって表面張力は様々です。加えて、Bradford 試薬のように試薬内に界面活性剤などが存在すると、表面張力を大幅に変動することがあります。結果として、測定に適した液柱の形成が困難となります。以上の問題は、サンプルの量は増やすことにより、解決できます。**タンパク質の測定には、2 µL 程度のサンプルをおすすめします。** サンプル量は吸光度や濃度算出に影響を及ぼしません。

タンパク測定後のクリーニング法

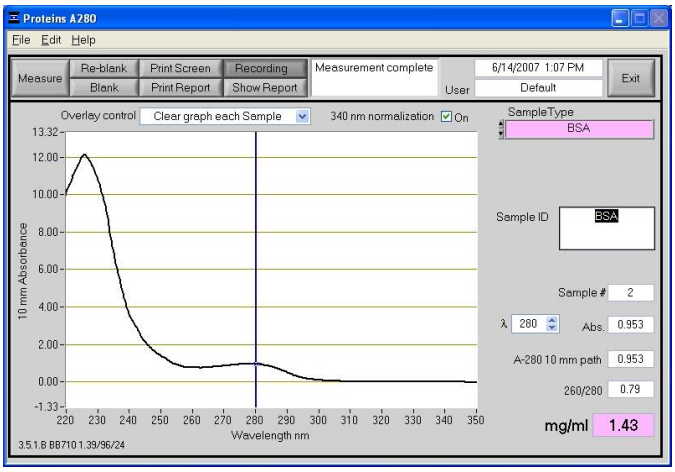
界面活性剤を含む溶液や試薬が測定台に残っていると、液柱を作りにくくなります。測定面の状態が悪化した場合は、乾いたラボペーパーで 30～40 回上下測定面を強く拭くことにより、測定面の状態が改善され、液柱が形成されます。また、測定面改善の迅速な手段として、NanoDrop リコンディショニングキット (PR-1) を使用する方法もあります。PR-1 キットに関する詳細な情報については、www.nanodrop.com をご参照ください。

測定濃度の範囲

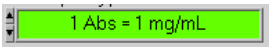
NanoDrop 1000 分光光度計では、タンパク質サンプルを最大 100 mg/ml (BSA) まで、希釈することなく測定します。 高濃度サンプルでは、本体が自動で高濃度を検知して、0.2 mm の光路長を使って吸光度を算定します。濃度範囲と標準的な再現精度の表を以下に示します。

	およその 検出限界 (下限値) (mg/ml)	**およその 検出限界 (上限値) (mg/ml)**	**測定の繰り返し精度 (n≧5 , SD: mg/ ml, CV: %)**
精製 BSA	0.10 mg/ml	100 mg/ml	範囲 0.10- 10 mg/ml: ± 0.10 mg/ml 範囲 >10 mg/ml: ± 2%

結果表示画面



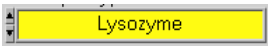
Sample Type (サンプルの種別): 精製タンパク質の分析と濃度の測定には、6 つのサンプルタイプから選択します。サンプルタイプは Sample Type ボックスをクリックして選べます。各サンプルタイプの内容については、以下に示します。



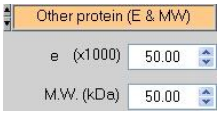
280 nm において 1.0 A (光路長 10 mm) の吸光度をもつ 0.1% (1 mg/ml) のタンパク質溶液として測定した標準的な基準。

Bovine Serum Albumin (牛血清アルブミン) 基準。1% (10 mg/ml) の BSA 溶液の 280 nm での吸光係数 6.7 を用いて、未知のタンパク質 (サンプル) 濃度を算出します。

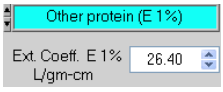
IgG 基準。1% (10 mg/ml) の IgG 溶液の 280 nm での吸光係数 13.7 を用いて、未知のタンパク質 (サンプル) 濃度を算出します。



Lysozyme (リゾチーム) 基準。1% (10 mg/ml) のリゾチーム溶液の 280 nm での吸光係数 26.4 を用いて、未知のタンパク質 (サンプル) 濃度を算出します。



ユーザー入力のモル吸光係数 (M^{-1} cm^{-1}) とキロダルトンでの分子量 (MW) からタンパク質濃度を算出します。e の最大値は 9999 X 1000 で、M.W.の最大値は 99999 X 1000 です。



1% (10 mg/ml) 溶液の吸光係数 (L $gm^{-1}cm^{-1}$) をユーザーが入力し、タンパク質濃度を算出します。

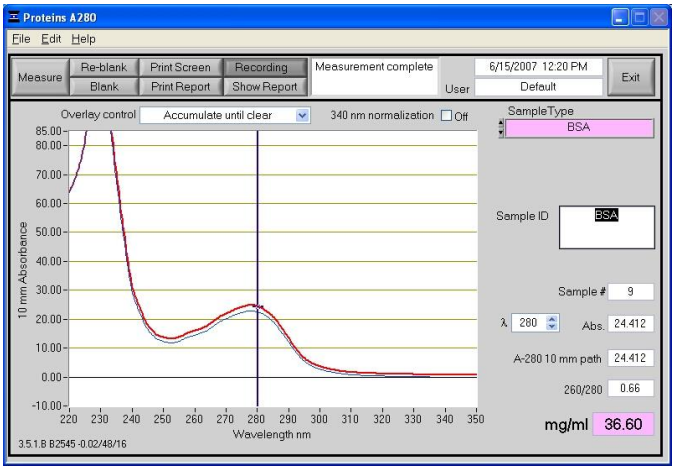
λ と Abs.: ユーザーが選択する波長カーソルと対応する吸光度です。波長は、カーソルのドラッグ、隣の上下矢印の使用、もしくは波長の直接入力により、選択できます。注意: ユーザー任意の波長および吸光度を使用しての算出は出来ません。

A280 10-mm Path: 測定されたサンプルの 280 nm における 10 mm 光路長相当の吸光度です。

A260/280: 260 nm と 280 nm におけるサンプル吸光度の比率です。

スペクトルのノーマライズ

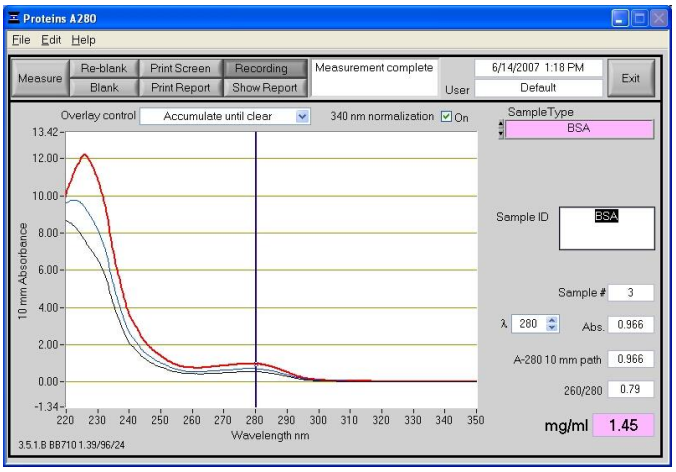
ほとんどゼロとなるべき 340 nm における吸光度にベースラインは自動的に設定されます。あらゆるスペクトルはノーマライズされ、同じフォーマットで保存されます。ベースラインのノーマライズ機能を無効にすることもできます。無効にすると、スペクトルはベースラインからのオフセットとなります。



注意: スペクトルベースラインのオフセットが大きい場合、算出されたタンパク質濃度が実際の値より高い場合があります。ある種のサンプルでは上記の例より、ベースラインオフセットが高くなる場合があります。

Spectrum Overlay Control

本機能を使用することにより、同一画面上に複数のスペクトルを表示することができます。最新のサンプルプロットは太線で、それ以前のプロットは異なる色で表示されます。下図をご覧ください。



デフォルトオプションでは測定ごとに画面がクリアされるように設定されております。Overlay Control では、デフォルト設定に加え、レポートごとの消去、もしくはユーザーが消去するまでのスペクトルの重ね書きができます。'Clear Now' に設定すれば、すべてのプロットを消去します。Overlay ファンクションが機能している

場合、核酸、およびタンパク質 A280 測定モードは 280 nm での吸光度に合わせて、y 軸を自動的に割り出します。注意: Overlay ファンクションが機能していると、”Blank” を取り直しても、既存のサンプルスペクトルは消去されません。

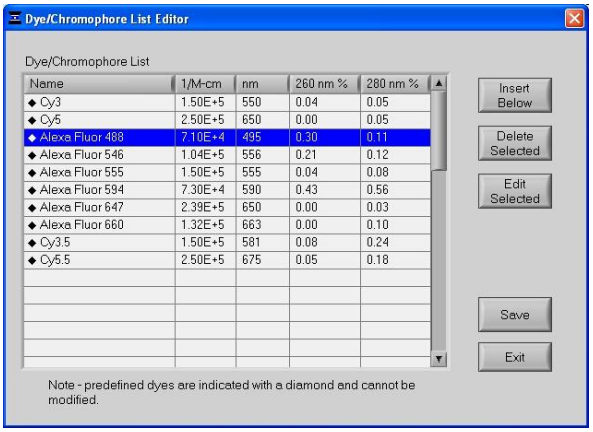
9. Proteins & Labels 測定モード

本測定モードは波長比を用いて、タンパク質濃度 (A280 nm)、プロテインアレイに結合した fluorescent dye の標識効率、もしくは metalloprotein (ヘモグロビン等) の純度を測定します。

蛍光 Dye の選択
現在、Proteins & Labels 測定モードで使用可能な蛍光 Dye は 9 種あります。メインメニュー上で "Dye/Chromophore Editor" を選択すると、プログラム済の Dye に加えて、ユーザー任意の蛍光 Dye を入力、保存することも出来ます。

Dye の選択は、スクロール矢印を使用する、もしくは Dye 1 か Dye 2 をハイライトすることによって、実行されます。各吸光波長、吸光係数、および 280 nm の % 修正値は、自動的に検出および濃度の算出に使用されます。NanoDrop 社でのデフォルト設定では、Dye 1 を Cy3 に、Dye 2 を Cy5 に設定しています。ドロップダウンメニューから選択できる蛍光 Dye に加えて、'None' のオプションを選択することも可能です。'None' を選択すると、Dye は選択されません。

注意: Dye の製造元に確認して、適切な修正値を入力してください。



サンプルの必要量
タンパク質の中には、疎水性のものもあれば、また親水性のものもあり、測定されるサンプルによって表面張力は様々です。加えて、Bradford 試薬のように試薬内に界面活性剤などが存在すると、表面張力を大幅に変動することがあります。このような場合は、サンプルの量を増やすことにより、解決できます。**タンパク質の測定には、2µL 以上のサンプルをおすすめします。**サンプル量は吸光度や濃度の算出に影響を及ぼしません。

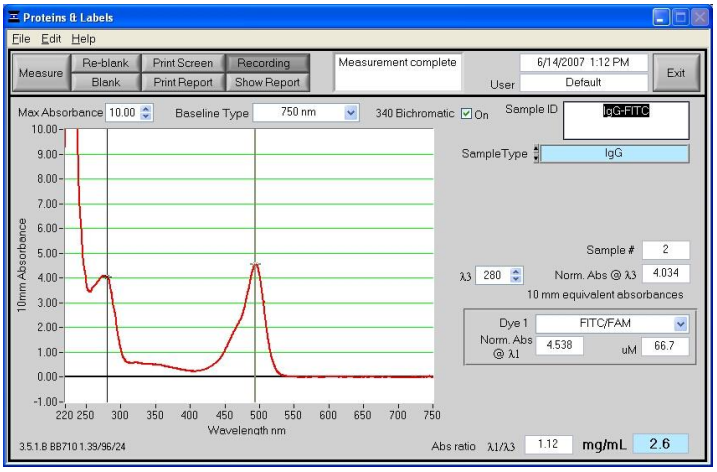
タンパク測定後のクリーニング法
界面活性剤を含む溶液や試薬が測定台に残っていると、液柱を作りにくくなります。測定面の状態が悪化した場合は、乾いたラボペーパーで 30～40 回上下測定面を強く拭くことにより、測定面の状態が改善され、液柱が形成されます。また、測定面改善の迅速な手段として、NanoDrop リコンディショニングキット (PR-1) を使用する方法もあります。PR-1 キットに関する詳細な情報については、www.nanodrop.com をご参照ください。

測定濃度の範囲

NanoDrop 1000 分光光度計ではタンパク質サンプルを 20 mg/ml (BSA) まで希釈することなく正確に測定します。濃度範囲と標準的な再現精度の表を以下に示します。

サンプルタイプ	およその 検出限界 (下限値)	およその 検出限界	測定の繰り返し精度 (n≧5 , SD: mg/ ml, CV: %)
精製 BSA	0.10 mg/mL	20 mg/mL	範囲 0.10- 10 mg/mL:± 0.10 mg/mL 範囲 > 10 mg/mL: ± 2%
Cy3	0.2 uM	100 uM	範囲 0.20- 4.0 pmol/µL:± 0.20 pmol/µL 範囲 > 4.0 pmol/µL: ± 2%

結果表示画面



Max Absorbance: 縦軸の上限を変更するときに使用します。

Sample Type: Proteins & Labels の解析と濃度測定に使用するサンプルは、タンパク質 A280 と同じ 6 つのサンプルタイプから選択できます。サンプルタイプは Sample Type ボックスをクリックするか、Sample Type ボックス左の上下矢印を使用し、ボックス内をスクロールすることで選べます。各サンプルタイプの詳細については本文セクション 8 “Protein A280 測定モード” の記述を参照してください。

λ3: 選択した吸光度です。

Norm Abs @λ3: 各波長におけるノーマライズされた吸光度 (10 mm 光路長換算) です。

Dye 1 (もしくは 2): 測定する Dye です。

Abs. Norm: 1 mm 光路長での Dye のノーマライズされた吸光度です。

pmol/µL Dye 1: Dye の吸光係数に基づく濃度です。算定について、詳しくは付録 “濃度の算出 (ベールの法則)” を参照してください。

Abs ratio λ1/λ3: ユーザーの選択した波長での吸光度 (λ3) に対して Dye1 の吸光度の比率です。

mg/mL: 260 nm での吸光度から 340 nm での吸光度を引いた値 (要は 340 nm でのノーマライズ) と、核酸分析定数を使用して算出した核酸濃度です。詳しくは付録 “濃度の算出 (ベールの法則” を参照してください。

ベースラインのタイプ

Proteins & Labels 測定モードでは、Baseline Type を 2 つから選択することができます。デフォルトの設定 (User Preferences) は表示を 750 nm でノーマライズしています。また、400-750 Slope Baseline Type では、750 nm で画面をノーマライズ し、400-750 nm の範囲でスロープ状のベースラインをノーマライズします。

また、340 nm でのノーマライゼーションの使用/不使用についても選択することができます。

10. タンパク質 BCA 測定モード

BCA (Bicinchoninic Acid) タンパク質定量法は、タンパク質濃度を測定する方法の一つです。タンパク質溶液や UV (280 nm) 吸光度の高い物質がある場合によく利用されます。タンパク質 A280 法とは異なり、BCA 定量法では、不明なタンパク質を測定する前に、検量線の作成が必要になります。タンパク質と作成される Cu-BCA キレートは、562 nm の波長で吸光度が測定されます。定量に使用される、予め調整された BCA や CuSO4 の試薬は、数多くのメーカーからキットの形で入手できます。それぞれのメーカーの説明書に従い調整してください。

サンプルの必要量

タンパク質の中には、疎水性のものもあれば、また親水性ものもあり、測定されるサンプルによって表面張力は様々です。加えて、Bradford 試薬のような試薬内に界面活性剤などが存在すると、表面張力を大幅に変動することがあります。以上の問題は、サンプルの量は増やすことにより、解決できます。**タンパク質の測定には、2µL 程度のサンプルをおすすめします。**サンプル量は吸光度や濃度算出に影響を及ぼしません。

タンパク測定後のクリーニング法

タンパクや界面活性剤を含む溶液が測定台に残っていると、液柱を作りにくくなります。測定面の状態が悪化した場合は、乾いたラボペーパーで 30～40 回上下測定面を強く拭くことにより、測定面の状態が改善され、液柱が形成されます。また、測定面改善の迅速な手段として、NanoDrop リコンディショニングキットを使用する方法もあります。PR-1 キットに関する詳細な情報については、www.nanodrop.com をご参照ください。

測定濃度の範囲

NanoDrop 1000 分光光度計では、スタンダード法が 0.20 mg/ml から 8.0 mg/ml (mg/ml) まで測定可能です。mini-BCA (ミニ BCA) 法では、およそ 0.01 ～ 0.20 mg/ml が測定可能です。.

	およその 検出限界 (下限値) (mg/ml)	**およその 検出限界 (上限値) (mg/ml)**	**測定の繰り返し精度 (n≧5 , SD: mg/ ml, CV: %)**
スタンダード BCA	0.2	8.0	± 2% (全範囲を通して)
ミニ BCA	0.01	0.20	± 0.01 mg/ml (全範囲を通して)

BCA キット、プロトコル、およびサンプルの準備

市販の BCA タンパク質測定キットのメーカーは、通常以下のような 2 種類の異なるタンパク質濃度範囲に対して、手順を説明しています。

- スタンダード BCA – 20 : 1 の試薬/サンプル 容量比率を使用。適切に Standard を用意するために、BCA 試薬 80 µL に対して、最小値 4 µL のサンプルの使用を推奨します。
- ミニ BCA – 1 : 1 の試薬/サンプル 容量比率を使用。PCR チューブやマイクロプレートを使用し、例えば 10 µL のサンプルと 10 µL の BCA 試薬を使って準備します。注意: 60°C で定量を実行するので、使用量を倍にすると、密閉したリアクションチューブ内の蒸発・凝縮による結果のズレが軽減されます。

キットの試薬に加え、検量線を作成するためのタンパク質 Standard (BSA や IgG) も、各メーカーによって提供されています。推奨される反応時間や温度をはじめ、定量に対しては、メーカーのプロトコルに従います。加えて、対象の分析範囲 (mg/ml) をカバーする Standard (BSA や IgG) で希釈系列サンプルを準備します。注意: NanoDrop 1000 ではより高濃度のタンパク質を測定することができます。メーカー提供のものより高濃度のタンパク質を測定する場合は、ユーザーがタンパク質 Standard を用意する必要があります。

結果表示画面

View Standard Curve (F8): 本ボタンを選択すると、検量線を見ることができます。

Sample Type: Reference、Standard 1～7、および Sample が選択できます。ソフトウェアは Reference、Standard の測定を促し、その後サンプルの測定を可能にします。

Replicate #: Reference と Standard の測定回数を示します。

Reset all Standard (F11): すべての Standard の測定結果を消去します。

Reset 1 Standard (F12): 選択された Standard の測定結果を消去します。

Absorbance at 562 nm: Cu-BCA 化合物の 562nm における吸光度 (1 mm 光路長相当) です。

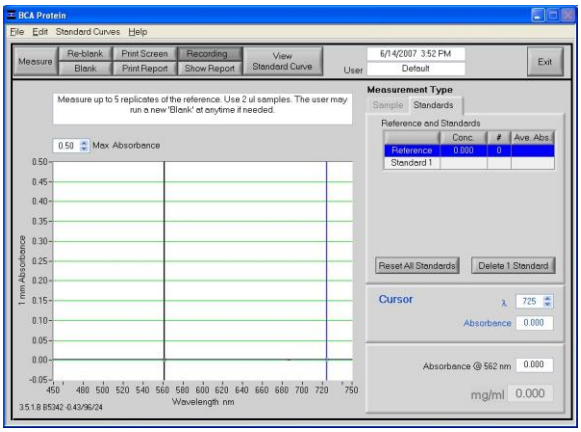
Cursor λ および Absorbance: ユーザーが選択する波長カーソルと対応する吸光度です。波長は、カーソルのドラッグ、隣の上下矢印の使用、もしくは波長の直接入力により、選択できます。注意: ユーザー任意の波長および吸光度を使用しての算出は出来ません。

mg/ml: サンプルの濃度を示します。

BCA 測定の操作

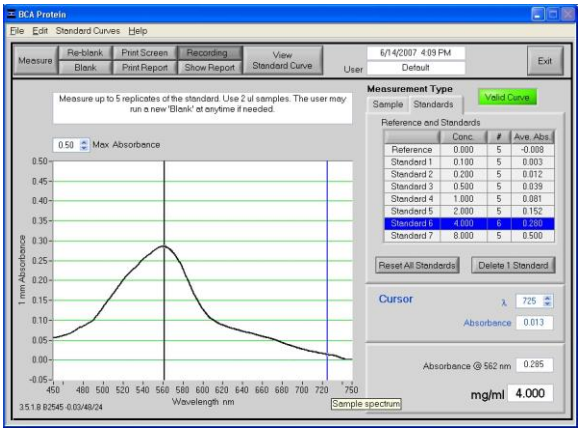
BCA アッセイを実行する際は、検量線が必要となります。ソフトウェアでは、検量線の保存と読み込みが可能ですが、メーカーのキットの説明書に従い、測定の都度、検量線の作成を行うことをお勧めします。また、検量線 “セットアップ” の読み込みも可能です。本機能により、以前保存した検量線で使用した一連の Standard を読み込むことができます。検量線の作成は、ソフトウェアに組み込まれています。検量線は Reference (タンパク質を含まない BCA 試薬) と Standard を使用して作成されます。マルチポイントの検量線では、7 つの異なる Standard のそれぞれについて、5 回まで測定できます。

検量線の作成を実行する前に、Blank の測定を行う必要があります。Blank として水を、“0” もしくは Reference サンプルとして、タンパク質を含まない dye 試薬を使用することをお勧めします。濃度の測定には、3 つの手順ステップがあります。検量線の作成を含めた、操作手順は次の通りです。



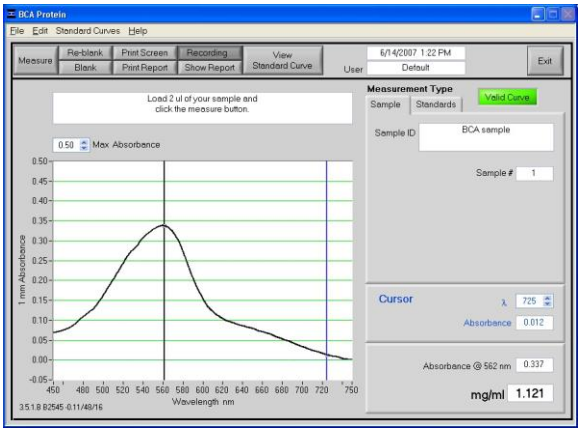
ステップ 1: “Reference” (BCA 試薬 – “0” Standard) の測定

注意: 操作手順は、画面右側の大き目のテキストボックスに表示されます。



ステップ 2: Standard の測定

それぞれの Standard について最大 5 回まで測定できます。最低 1 つの Standard と Reference、または 2 つの Standard が測定されるまで、サンプルの測定ができません。多項式フィッティングの場合は、選択した次数によって、必要とされる Standard 測定の数が異なります。



ステップ 3: Sample の測定

サンプル濃度は、未知サンプルに隣接する 2 つの Standard の内挿もしくは多項式フィッティングを使用してによって算出されます。注意: 濃度を算出するためには、サンプルは検量線の範囲内となる必要があります。

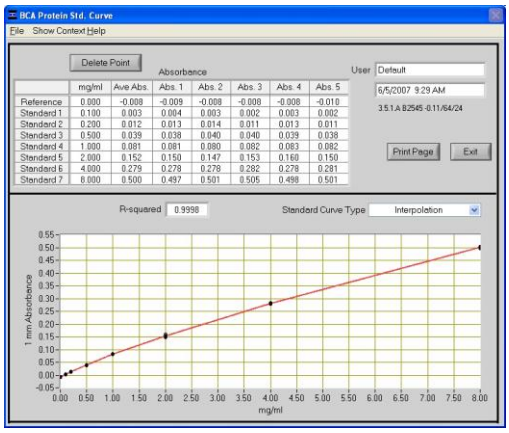
Standard Curve Features

Standard Curve プルダウンメニューより ‘Save as’ もしくは ‘Reload Standard Curve’ ファンクションを選択することで、検量線の保存およびリロードが可能となります。’View Standard Curve’ ボタンを選ぶと、いつでも検量線を表示することができます。ver. 3.5.1. から、’Load Standard Curve Set-up’ が追加され、検量線に利用した一連の Standard の濃度を読み込むことができるようになりました。

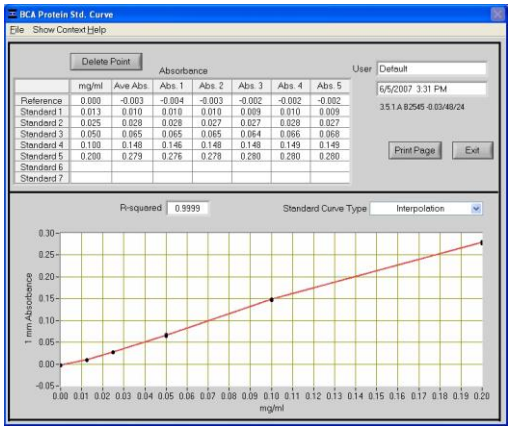
Delete Standard Point

表上の削除するデータポイントを選んだ後、Delete Point ボタンを選択すると、ポイントが削除されます。誤った操作をした場合や、データがおかしい場合は、”Delete 1 Standard” を押して、対象の Standard 液

の取り直しや、”Reset all Standards” を押してすべてのデータの取り直しをすることができます。



スタンダード BCA 検量線:
0.2 – 8.0 mg/ml



mini-BCA 検量線:
0.01 – 0.20 mg/ml

BCA 測定モードの終了

すべての未知濃度サンプルの測定を終えるまでは、絶対に BCA 測定モードを終了しないで下さい!

11. タンパク質 Lowry 測定モード

Lowry 改良法は、広く用いられている Lowry 法に替わるタンパク質濃度の測定法です。BCA や Bradford アッセイのように、Lowry 改良法も未知濃度のタンパク質測定の際には検量線の作成が必要となります。Lowry 改良法の手順には、アルカリ溶液中でのタンパク質と cupric sulfate の反応による、銅ータンパク質錯体の生成を含みます。Folin-Ciocalteu 試薬はキレートされた銅錯体と反応し、650 nm で測定され、405 nm でノーマライズされる青い親水性の産物を生成します。アッセイで使用する試薬は多くのメーカーからキットの形で入手できます。使用に関しては、各メーカーの指示に従ってください。

サンプルの必要量

タンパク質の中には、疎水性のものもあれば、また親水性のものもあり、測定されるサンプルによって表面張力は様々です。加えて、Bradford 試薬のように試薬内に界面活性剤などが存在すると、表面張力を大幅に変動することがあります。以上の問題は、サンプルの量を増やすことにより、解決できます。**タンパク質の測定には、2 µL 以上のサンプルをおすすめします。**サンプル量は吸光度や濃度の算出に影響を及ぼしません。

タンパク測定後のクリーニング法

タンパクや界面活性剤を含む溶液が測定台に残っていると、液柱を作りにくくなります。測定面の状態が悪化した場合は、乾いたラボペーパーで 30～40 回上下測定面を強く拭くことにより、測定面の状態が改善され、液柱が形成されます。また、測定面改善の迅速な手段として、NanoDrop リコンディショニングキットを使用する方法もあります。PR-1 キットに関する詳細な情報については、www.nanodrop.com をご参照ください。

測定濃度の範囲

NanoDrop 1000 分光光度計での、Lowry 改良法の検出濃度範囲は 0.20～4.0 mg/mL です。

	およその 検出限界 (下限値) (mg/ml)	およその 検出限界 (上限値) (mg/ml)	測定の繰り返し精度 (n≧5 , SD: mg/ml, CV: %)
Lowry 改良法	0.2	4.0	± 2% (すべての範囲を通して)

Lowry 改良法キット、プロトコル、およびサンプルの準備

市販の Lowry タンパク質測定キットのメーカーは、通常、使用手順について説明しています。それぞれ参照してください。

キットの試薬に加え、検量線を作成するためのタンパク質 Standards (BSA) も各メーカーによって提供されています。推奨される反応時間や温度をはじめ、定量に対しては、メーカーのプロトコルに従ってください。さらに対象の分析範囲 (mg/mL) をカバーする、それぞれの Standard (BSA 等) で希釈系列サンプルを準備します。注: NanoDrop 1000 ではより高濃度のタンパク質も測定することができます。その場合、メーカーによって提供されるよりも、高濃度のタンパク質 Standard を作成する必要があります。

結果表示画面

View Standard Curve (F8): 本ボタンを選択すると検量線を見ることができます。

Sample Type: Reference、Standard 1～7、そして Sample が選択できます。ソフトウェアは Reference、Standard の測定を促し、その後サンプルの測定を可能にします。

Replicate #: Reference と Standard の測定回数を示します。

Reset all Standard (F11): すべての Standard の測定結果を消去します。

Reset 1 Standard (F12): 選択された Standard の測定結果を消去します。

Absorbance at 650 nm: Cu 化合物の 650 nm における吸光度 (1 mm 光路長相当) です。

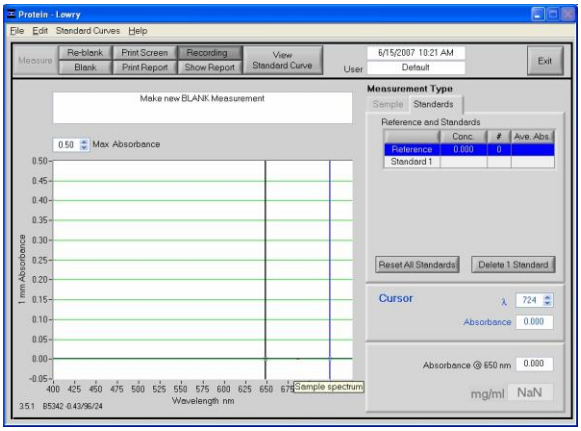
Cursor λ および Absorbance: ユーザーが選択する波長カーソルと対応する吸光度です。波長は、カーソルのドラッグ、隣の上下矢印の使用、もしくは波長の直接入力により、選択できます。注意: ユーザー任意の波長および吸光度を使用しての算出は出来ません。

mg/mL: サンプルの濃度を示します。

Lowry 測定の操作

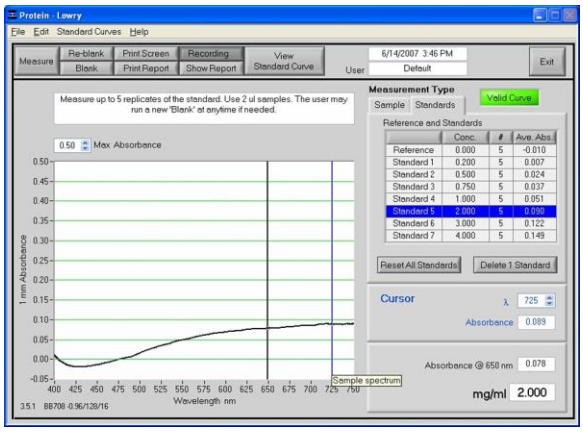
Lowry アッセイを実行する際は、検量線が必要となります。ソフトウェアでは、検量線の保存と読み込みが可能ですが、メーカーのキットの説明書に従い、測定の都度、検量線の作成を行うことをお勧めします。また、検量線 “セットアップ” の読み込みも可能です。本機能により、以前保存した検量線で使用した一連の Standard を読み込むことができます。検量線の作成は、ソフトウェアに組み込まれています。検量線は Reference (タンパク質を含まない Lowry 改良法試薬) と Standard を使用して作成されます。マルチポイントの検量線では、7 つの異なる Standard のそれぞれについて、5 回まで測定できます。

検量線の作成を実行する前に、Blank の測定を行う必要があります。Blank として水を、“0” もしくは Reference サンプルとして、タンパク質を含まない dye 試薬を使用することをお勧めします。濃度の測定には、3 つの手順ステップがあります。検量線の作成を含めた、操作手順は次の通りです。



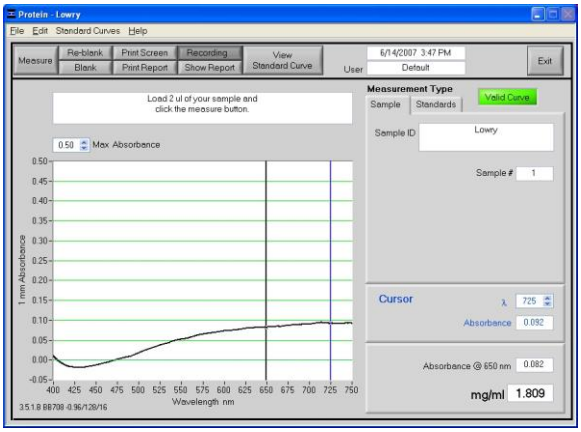
ステップ 1: “Reference” (Lowry 試薬 – “0” Standard) の測定

注意: 操作手順は、画面右側の大き目のテキストボックスに表示されます。



ステップ 2: Standard の測定

それぞれの Standard についての最大 5 回まで測定できます。最低 1 つの Standard と Reference または 2 つの Standard が測定されるまで、サンプルの測定はできません。多項式フィッティングの場合は、選択した次数によって、必要とされる Standard 測定の数が異なります。



ステップ 3: Samples の測定

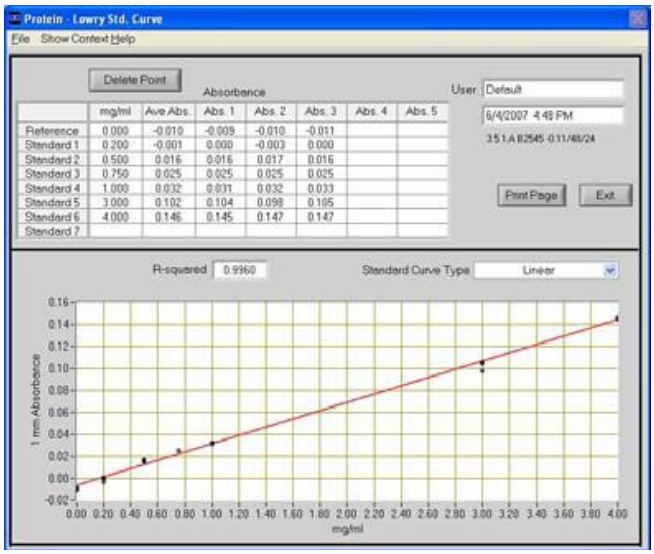
サンプル濃度は、未知サンプルに隣接する 2 つの Standard の内挿もしくは多項式フィッティングを使用してによって算出されます。注意: 濃度を算出するためには、サンプルは検量線の範囲内となる必要があります。

Standard Curve Features

Standard Curve プルダウンメニューより 'Save as' もしくは 'Reload Standard Curve' ファンクションを選択することで、検量線の保存およびリロードが可能となります。'View Standard Curve' ボタンを選ぶと、いつでも検量線を表示することができます。ver. 3.5.1. から、'Load Standard Curve Set-up' が追加され、検量線に利用した一連の Standard の濃度を読み込むことができるようになりました。

Delete Standard Point

表上の削除するデータポイントを選んだ後、Delete Point ボタンを選択すると、ポイントが削除されます。誤った操作をした場合や、データがおかしい場合は、"Delete 1 Standard" を押して、対象の Standard 液の取り直しや、"Reset all Standards" を押してすべてのデータの取り直しをすることができます。



Lowry 改良法の検量線:
0.2-4 mg/ml

Lowry 測定モードの終了

すべての未知濃度サンプルの測定を終えるまでは、絶対に Lowry 測定モードを終了しないでください。

12. タンパク質 Bradford 測定モード

Bradford 定量法も、タンパク質濃度の測定によく利用される方法の一つです。低検出感度が要求される低濃度タンパク質溶液や UV (280 nm) 吸光度の高い物質がある場合に、よく利用されます。BCA 法と同じように、Bradford 法では、未知濃度のタンパク質を測定する前に、検量線の作成が必要になります。

BCA 定量法でモニターされる BCA-Cu キレートとは異なり、Bradford 法では、タンパク質が誘発する吸光度による 595 nm へのクマシーブルー色素のシフトが、タンパク質濃度の尺度として使用されます。クマシーブルー試薬、アルコール、および表面活性剤を含有する単独の安定試薬混合液が、数多くのメーカーからキットの形で入手できます。すべての Standard やサンプル (未検) に対しては、メーカーのアドバイスに従って、調整します。

サンプルの必要量

タンパク質の中には、疎水性のものもあれば、親水性ものもあり、測定されるサンプルによって表面張力は様々です。加えて、Bradford 試薬のような試薬内に界面活性剤などが存在すると、表面張力を大幅に変動することがあります。以上のような問題は、サンプルの量は増やすことにより、解決できます。**タンパク質の測定には、2 µL 程度のサンプルをおすすめします。**サンプル量は吸光度や濃度算出に影響を及ぼしません。

タンパク測定後のクリーニング法

界面活性剤を含む溶液や試薬が測定台に残っていると、液柱を作りにくくなります。測定面の状態が悪化した場合は、乾いたラボペーパーで 30～40 回上下測定面を強く拭くことにより、測定面の状態が改善され、液柱が形成されます。また、測定面改善の迅速な手段として、NanoDrop リコンディショニングキットを使用する方法もあります。PR-1 キットに関する詳細な情報については、www.nanodrop.com をご参照ください。

測定濃度の範囲

NanoDrop 1000 分光光度計では、標準の Bradford 定量法を使用して、100 ug/ml から数千マイクログラム/ml までの未検タンパク質の濃度が、測定できます。最適な直線性は、100～1000 ug/ml の範囲にあります。ミニ Bradford 定量法では、およそ 15～125 ug/ml の範囲がカバーされます。

クマシー色素-色素、およびクマシー色素-タンパク質のアグリゲートは、クマシー色素ベースのタンパク質検定でしばしば見かけます。時間が経過すると、吸光度の表示に大きな揺らぎを引き起こす可能性がある、微粒子が観察できます。本体の 1.0 mm 光路長、Bradford (Coomassie 色素) 試薬の濃度、そして酸性 pH の結果として、595 nm における全検体 (タンパク質·色素) のシグナルが 0.150 A 以下に限られる点に注意してください。Bradford アッセイで限られたアッセイシグナルを得たい場合は、Standards (標準) と Sample (未検) の測定を 3 回測定することをお勧めします。

	およその 検出限界 (下限値) (ug/ml)	**およその 検出限界 (上限値) (ug/ml)**	**測定の繰り返し精度 (n≧5 , SD: ug/ml, CV: %)**
Standard Bradford 法	100 ug/ml	8000 ug/ml	サンプル範囲 100-500 ug/ml: ± 25 ug/ml サンプル範囲 500-8000 ug/ml: ± 5%
ミニ Bradford 法	15 ug/ml	100 ug/ml	サンプル範囲 15-50 ug/ml: ± 4 ug/ml サンプル範囲 50-125 ug/ml: ± 5%

Bradford キット、プロトコル、およびサンプルの準備
市販の Bradford タンパク質測定キットのメーカーは、通常以下のような 2 種類の異なる濃度範囲に対して、手順を説明しています。

- レギュラー定量 – 50 : 1 の試薬/サンプル 容量比率を使用。 適切に Standard を準備するために、Bradford 試薬 200 µL に対して、最小値 4 µL のサンプルの使用が推奨されます。

- ミニ定量 – 1 : 1 の試薬/サンプル 容量比率を使用。 PCR チューブやマイクロプレートを用い、10 µL のサンプルと 1 µL の Bradford 試薬を使って準備します。

キットの試薬に加え、検量線を作成するためのタンパク質 Standard (BSA) も各メーカーによって提供されています。推奨される反応時間や温度をはじめ、定量に対しては、メーカーのプロトコルに従ってください。さらに対象の分析範囲 (mg/mL) をカバーする、それぞれの Standard (BSA 等) で希釈系列サンプルを準備します。注: NanoDrop 1000 ではより高濃度のタンパク質も測定することができます。その場合、メーカーによって提供されるよりも、高濃度のタンパク質 Standard を作成する必要があります。

結果表示画面

View Standard Curve (F8): 本ボタンを選択すると、検量線を見ることができます。

Sample Type: Reference、Standard 1～7、および Sample が選択できます。ソフトウェアは Reference、Standard の測定を促し、その後サンプルの測定を可能にします。

Replicate #: Reference と Standard の測定回数を示します。

Reset all Standard (F11): すべての Standard の測定結果を消去します。

Reset 1 Standard (F12): 選択された Standard の測定結果を消去します。

Absorbance at 595 nm: タンパク質 - dye 化合物の 595 nm における吸光度 (1 mm 光路長相当) です。

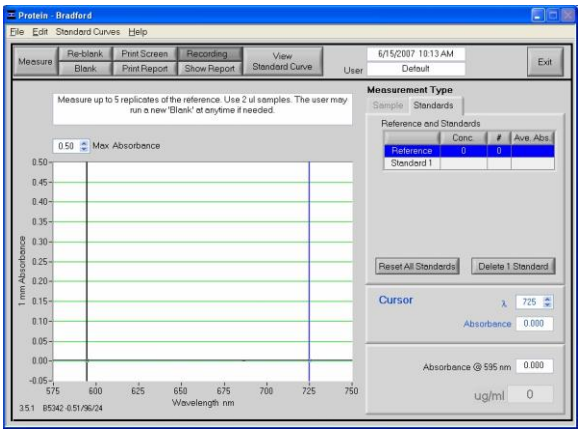
Cursor λ および Absorbance: ユーザーが選択する波長カーソルと対応する吸光度です。波長は、カーソルのドラッグ、隣の上下矢印の使用、もしくは波長の直接入力により、選択できます。注意: ユーザー任意の波長および吸光度を使用しての算出は出来ません。

ug/ml: サンプルの濃度を示します。

Bradford タンパク質測定の操作
Bradford アッセイを実行する際は、検量線が必要となります。ソフトウェアでは、検量線の保存と読み込みが可能ですが、メーカーのキットの説明書に従い、測定の都度、検量線の作成を行うことをお勧めします。また、検量線 “セットアップ” の読み込みも可能です。本機能により、以前保存した検量線で使用した一連の Standard を読み込むことができます。検量線の作成は、ソフトウェアに組み込まれています。検量線は Reference (タンパク質を含まない Bradford 試薬) と Standard を使用して作成されます。マルチポイントの検量線では、7 つの異なる Standard のそれぞれについて、5 回まで測定できます。

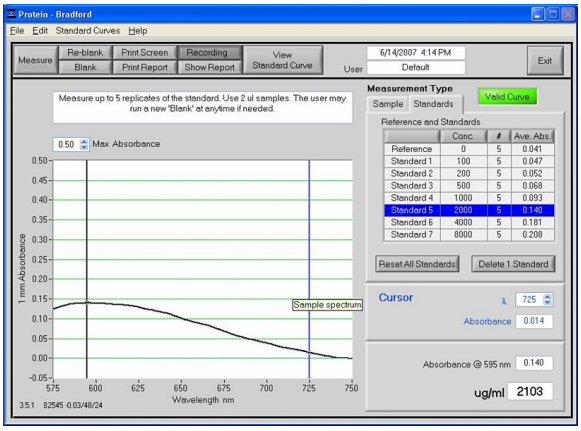
検量線の作成を実行する前に、Blank の測定を行う必要があります。Blank として水を、“0” もしくは

Reference サンプルとして、タンパク質を含まない dye 試薬を使用することをお勧めします。濃度の測定には、3 つの手順ステップがあります。検量線の作成を含めた、操作手順は次の通りです。



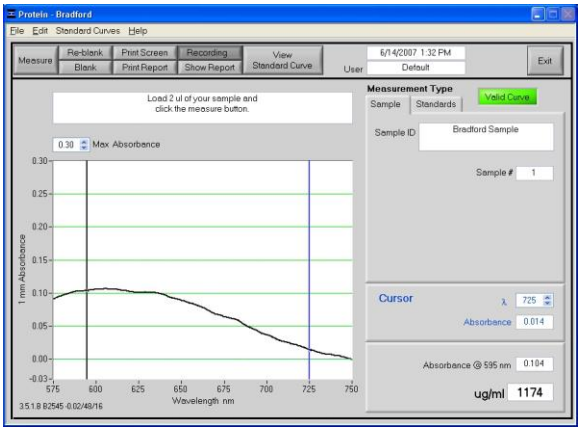
ス テ ッ プ　1: “Reference” (Bradford 試薬 – “0” Standard) の測定

注意: 操作手順は、画面右側の大き目のテキストボックスに表示されます。



ステップ 2: Standard の測定

それぞれの Standard についての最大 5 回まで測定できます。最低 1 つの Standard と Reference または 2 つの Standard が測定されるまで、サンプルの測定はできません。多項式フィッティングの場合は、選択した次数によって、必要とされる Standard 測定の数が異なります。



ステップ 3: Samples の測定

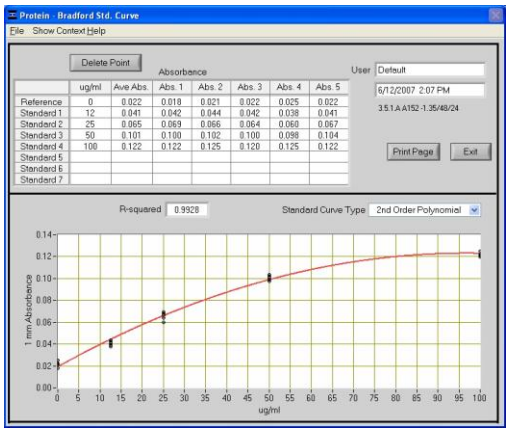
サンプル濃度は、未知サンプルに隣接する 2 つの Standard の内挿もしくは多項式フィッティングを使用してによって算出されます。注意: 濃度を算出するためには、サンプルは検量線の範囲内となる必要があります。

Standard Curve Features

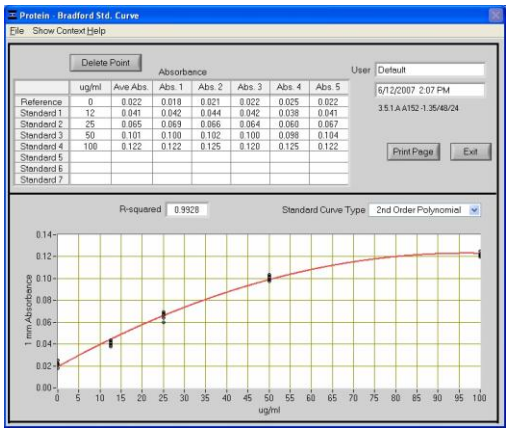
Standard Curve プルダウンメニューより ‘Save as’ もしくは ‘Reload Standard Curve’ ファンクションを選択することで、検量線の保存およびリロードが可能となります。’View Standard Curve’ ボタンを選ぶと、いつでも検量線を表示することができます。ver. 3.5.1. から、’Load Standard Curve Set-up’ が追加され、検量線に利用した一連の Standard の濃度を読み込むことができるようになりました。

Delete Standard Point

表上の削除するデータポイントを選んだ後、Delete Point ボタンを選択すると、ポイントが削除されます。誤った操作をした場合や、データがおかしい場合は、”Delete 1 Standard” を押して、対象の Standard 液の取り直しや、”Reset all Standards” を押してすべてのデータの取り直しをすることができます。



スタンダード Bradford 曲線の範囲は 200-8000 ug/ml。直線範囲が 100-1000 ug/ml である点に注意します。



ミニ Bradford 定量法の範囲はおよそ 15-100 ug/ml。

Bradford モードの終了

すべての未知濃度サンプルの測定を終えるまでは、絶対に Bradford 測定モードを終了しないで下さい!

13. Protein Pierce 660nm 測定モード

Thermo Scientific Pierce 660 nm Protein Assay 試薬は溶液中の微量タンパク質について、迅速、正確、かつ再現性のある比色定量を実現する試薬キットです。本試薬は、還元剤および界面活性剤を含むサンプル中の総タンパク質濃度の測定に最適となっております。

ダイナミックレンジ
本アッセイは、試薬/サンプル比 15:1 で使用した場合、BSA のリニアレンジが 50-2000 ug/mL となります。試薬/サンプル比 7.5:1 で使用した場合、アッセイの感度は上昇し、リニアレンジは 25-1000 ug/mL となります。

アッセイタイプ	およその 検出限界 (下限値)	およその 検出限界 (上限値)	測定の繰り返し精度 (最低 5 反復) (SD= mg/mL; CV= %)
15:1	50 ug/ml	2000 ug/ml	± 5% (レンジ全体を通じて)
7.5:1	25 ug/ml	1000 ug/ml	± 5% (レンジ全体を通じて)

- レギュラー定量 – 15 : 1 の試薬/サンプル 容量比率を使用。 適切に Standard を用意するためには、Pierce 660 nm 試薬 60 µL に対して、最小値 4 µL のサンプルの使用が推奨されます。
- ミニ定量 – 7.5 : 1 の試薬/サンプル 容量比率を使用。 PCR チューブを用い、6 µL のサンプルと 45 µL の Pierce 660 nm 試薬を使って準備します。

推奨される反応時間や温度をはじめ、定量に対しては、メーカーのプロトコルに従ってください。さらに対象の分析範囲 (mg/mL) をカバーする、それぞれの Standard (BSA 等) で希釈系列サンプルを準備します。

注意: NanoDrop 1000 ではより高濃度のタンパク質も測定することができます。その場合、メーカーによって提供されるよりも、高濃度のタンパク質 Standard を作成する必要があります。

結果表示画面

View Standard Curve (F8): このボタンを選択すると、検量線を見ることができます。

Sample Type: Reference、Standard 1～7、および Sample が選択できます。ソフトウェアは Reference、Standard の測定を促し、その後サンプルの測定を可能にします。

Replicate #: Reference と Standard の測定回数を示します。

Reset all Standard (F11): すべての Standard の測定結果を消去します。

Reset 1 Standard (F12): 選択された Standard の測定結果を消去します。

Absorbance at 660 nm: タンパク質 - dye 化合物の 660 nm における吸光度 (1 mm 光路長相当) です。

Cursor λ および Absorbance: ユーザーが選択する波長カーソルと対応する吸光度です。波長は、カーソルのドラッグ、隣の上下矢印の使用、もしくは波長の直接入力により、選択できます。注意: ユーザー任意の波長および吸光度を使用しての算出は出来ません。

ug/ml: サンプルの濃度を示します。

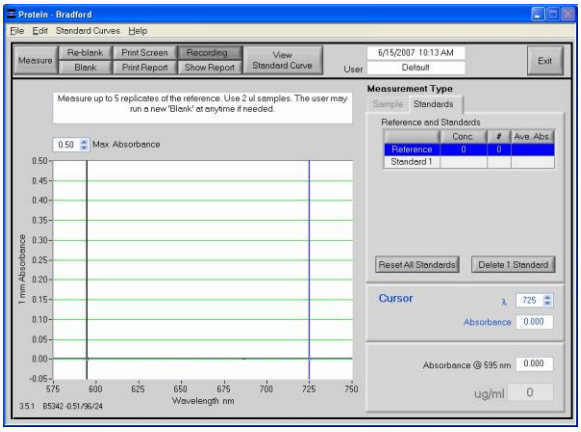
Pierce 660 nm タンパク質測定の操作

Pierce 660 nm アッセイを実行する際は、検量線が必要となります。ソフトウェアでは、検量線の保存と読み込みが可能ですが、メーカーのキットの説明書に従い、測定の都度、検量線の作成を行うことをお勧めします。また、検量線 “セットアップ” の読み込みも可能です。本機能により、以前保存した検量線で使用した一連の Standard を読み込むことができます。検量線の作成は、ソフトウェアに組み込まれています。検量線は Reference (タンパク質を含まない試薬のみ) と Standard を使用して作成されます。マルチポイントの検量線では、7 つの異なる Standard のそれぞれについて、5 回まで測定できます。

検量線の作成を実行する前に、Blank の測定を行う必要があります。Blank および “0” Reference サンプルとして、タンパク質を含まない dye 試薬を使用することをお勧めします。

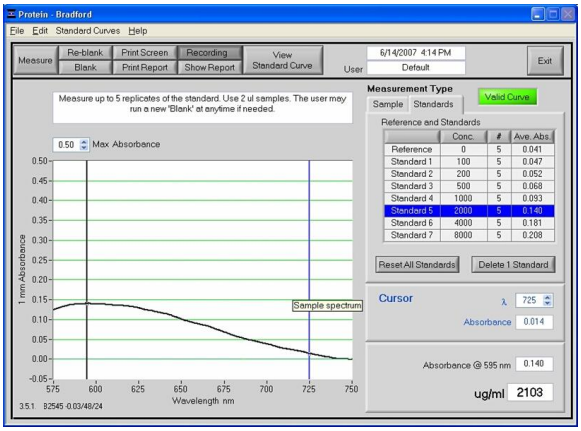
注意: NanoDrop 1000 を使用する他の比色定量と異なり、本アッセイでは Blank としての水の使用は推奨されません。

濃度の測定には、3 つの手順ステップがあります。検量線の作成を含めた、操作手順は次の通りです。



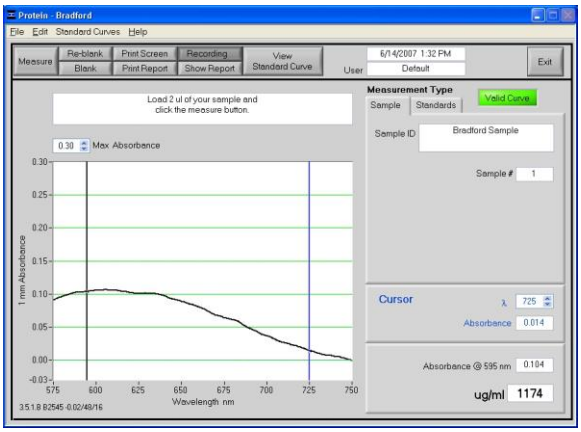
ステップ 1: “Reference” (660 nm 試薬 – “0” Standard) の測定

注意: 操作手順は、画面右側の大き目のテキストボックスに表示されます。



ステップ 2: Standard の測定

それぞれの Standard についての最大 5 回まで測定できます。最低 1 つの Standard と Reference または 2 つの Standard が測定されるまで、サンプルの測定はできません。多項式フィッティングの場合は、選択した次数によって、必要とされる Standard 測定の数が異なります。



ステップ 3: Samples の測定

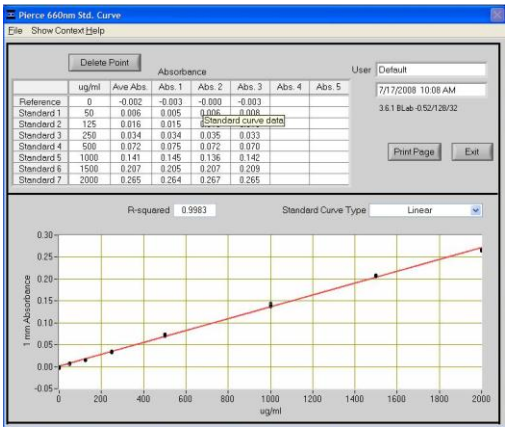
サンプル濃度は、未知サンプルに隣接する 2 つの Standard の内挿もしくは多項式フィッティングを使用して算出されます。注意: 濃度 (mg/mL) を算出するためには、サンプル (未知) は検量線の範囲内となる必要があります。

Standard Curve Features

Standard Curve プルダウンメニューより 'Save as' もしくは 'Reload Standard Curve' ファンクションを選択することで、検量線の保存およびリロードが可能となります。'View Standard Curve' ボタンを選ぶと、いつでも検量線を表示することができます。

Delete Standard Point

表上の削除するデータポイントを選んだ後、Delete Point ボタンを選択すると、ポイントが削除されます。誤った操作をした場合や、データがおかしい場合は、"Delete 1 Standard" を押して、対象の Standard 液の取り直しや、"Reset all Standards" を押してすべてのデータの取り直しをすることができます。



試薬/サンプル比 15:1 のアッセイでは 500-2000 ug/mL の範囲をカバーします。

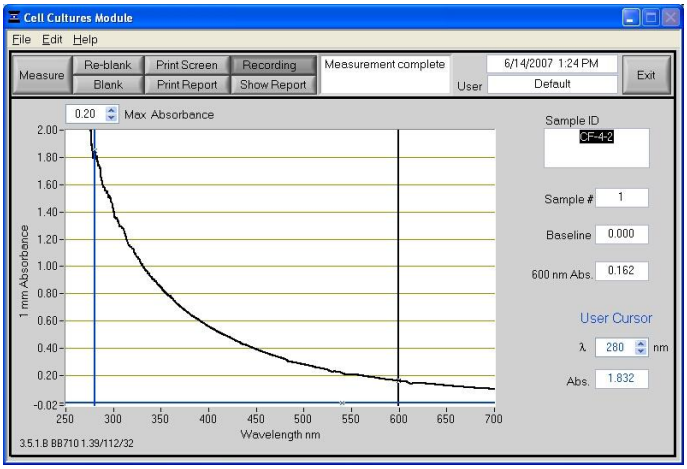
14. セルカルチャー測定モード

分光光度計を使った非吸収性浮遊細胞の測定は、濁度計などの代わりに良く使われる方法です。分光光度計を扱うメーカーによって測定法に違いがあるようです。

注意: NanoDrop 1000 分光光度計のセルカルチャーモードでの吸光値と、キュベットを使用するシステムでの同様の吸光値の大きな相違は、光路長の短さ (1 mm と 1 cm) となります。使用する分光光度計の光学系と懸濁液中の細胞型の両方に検出結果が左右される場合、吸光値の相違が正確に 10 倍とならない場合があります。

“Cell Cultures” 測定モードでは、サンプルスペクトルが 220～700 nm まで表示されます。一般的な 600 nm 固定波長での吸光度と波長カーソルバーによる任意の波長での吸光度測定が可能です。

結果表示画面



600nm Absorbance: 600 nm における 1 mm 光路長での吸光度を示します。

λ および Absorb: ユーザーが選択する波長カーソルと対応する吸光度です。波長は、カーソルのドラッグ、隣の上下矢印の使用、もしくは波長の直接入力により、選択できます。

Baseline: 測定後、ベースラインをドラッグして調整することが出来ます。吸光度は動かしたベースラインに従って、表示し直されます。

Max Absorbance: 縦軸のスケールを設定し直すのに使用します。

サンプルの必要量

確実なサンプル液柱を形成するには、1 µL のサンプルで十分であることが分かっています。ただし、ピペッターの精度やサンプルの特性によって、2 µL のサンプルが必要となる場合もあります。

細胞懸濁液濃度

1 mm 光路長であるため、NanoDrop 1000 では、キュベットを使用した (10 mm) 分光光度計が測定できる 10 倍濃度の吸光度が測定できます。スペクトル全体が表示されるため、600 nm 以外における吸光度

を観察できます。

サンプルの均一性

吸光度を測定する場合、細胞が均一に浮遊していることを確認し、細胞の沈殿を避けるためにも速やかに測定を実行してください。

測定面の汚染除去

汚染除去の必要な場合は、次亜塩素酸ナトリウムの 0.5 % 溶液 (市販の漂白剤を 1:10 希釈 – 使用の都度用意) 等の消毒液を使用し、上下測定面の生理活性物質を除去してください。測定面のオプティカル部分の金属は SUS303 ステンレス鋼を使用し、一般的なラボの薬品に対して耐性があります (付録「溶媒耐腐食性」を参照)。注意: 希釈漂白剤を滴下する際は、噴霧ボトルを使用しないでください。

15. 保存データと Data Viewer

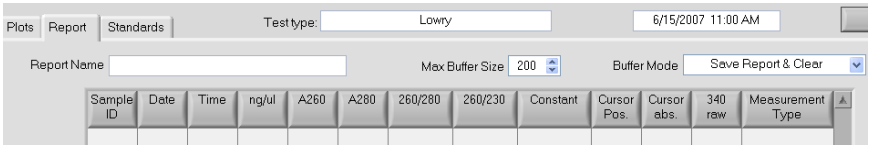
すべての測定モードのサンプルデータは自動的にアーカイブファイルに保存され、Data Viewer ソフトウェアもしくは MS Excel 等の表計算ソフトウェアから開くことが出来ます。

アーカイブファイルの作成
測定モードを開始すると、ログインした各ユーザー用に、それぞれの測定モードについてアーカイブファイルが作成されます。各ユーザーによって実行された測定は、対象のアーカイブファイルに保存されます。各ファイルの名前は、使用する測定モード名と測定日によって構成されます。例えば、”Nucleic Acid 2007 06 04 .ndj” と名付けられたアーカイブファイルは、2007 年 6 月 4 日より開始された核酸測定 (Nucleic Acid) のデータとなります。これらのファイルには、Data Viewier での自動始動を可能とする特有の拡張子 “.ndj” が与えられています。

編集または/およびリフォーマットしたデータに、ユーザー任意の名前を付けて保存をすることも可能です。より分析の必要な波長データに関しては、スペクトルをリプロットすることもできます。

注意 1: 保存データ中の吸光度データは、スクリーン上での表示と同様に表されます。核酸、タンパク質 A280、および Protein & Labels 測定モードでは、1.0 cm (10.0 mm) 光路長ベースで保存されます。MicroArray、UV-Vis、タンパク質 BCA、Bradford、Lowry、およびセルカルチャー測定モードでは、データは 1.0 mm (0.1 cm) 光路長でノーマライズされます。高い吸光度の UV-Vis サンプルの場合、データは 0.1 mm 光路長をベースとして保存されます。

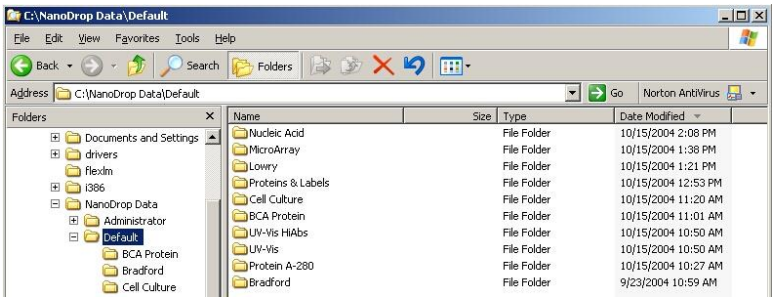
注意 2: すべての測定モードのデータには、’Measurement Type’ と名付けられた行が含まれています。各測定の Mesurement Type の行には ‘Measure’、‘Blank’、もしくは ‘Reblank’ と記入されています。’Measure’ と入力されている場合は、対応す列は保存されている blank 値を使用した通常の検出データを表しています。’Blank’ と入力されている場合は、初期 Blank データであることを表しています。’Reblank’ と入力されている場合は、既存の測定結果を新しい blank で再分析したデータとなります。



データの保存階層
保存ファイルの階層は以下の通りです。

C: \NanoDrop Data → User Name → 各測定モード名 (BCA Protein、Lowry、Bradford、Cell Culture、Micro Array、Nucleic Acid、Protein A-280、UV-Vis もしくは UV-VIs HiAbs)

下図に示されているように、すべての保存データファイルは各ユーザーフォルダ内のそれぞれの測定モードフォルダに保存されます。



ユーザー任意の保存ファイルロケーション
もともとのデータの保存場所に加えて、ユーザーは保存ロケーションを追加することができます。本オプションはメインメニューの User Preference 内の Archiving タブ上で、'Duplicate Data Storage ボックス' を 'On' に設定し、Duplicate Data フォルダ下の ファイルフォルダーをクリックして、ファイルパスを選択することで設定できます。User Preferences ウィンドウを終了する前に、'Save Preferences' ボタンをクリックして、選択したパスを保存してください。

測定完了後直ちにすべてのデータは、アーカイブファイルへと記録されます。ソフトウェアもしくは PC の偶発的なシャットダウンは、アーカイブファイルに何ら影響を与えません。

Data Viewer
Data Viewer はオペレーティングソフトウェアに組み込まれた、総合データーレポーティングソフトウェアです。本プログラムにより、リポート構成のカスタマイズ、保存データのインポート、および以前作製されたデータのリプロットが可能となります。Data Viewer を使用すると、データのレビューが効率的にできます。測定中、各測定モードの Show Report ファンクションより本機能にアクセスすることができます。また、メインメニューからもアクセスすることができます。Data Viewer モードを使用するために、PC に NanoDrop 1000 分光光度計を接続する必要はありません。

Data Viewer の機能

Data Viewer は Plots、Reports、および Standard Curves の 2 つもしくは 3 つのタブラー形式のページで構成されています。タブをクリックすることで、任意のページにアクセスすることができます。

メインメニューもしくは Show Report を通じて、Data Viewer にアクセスすると、Report ページが開かれます。注意: Show Report を通じて Data Viewer にアクセスする場合は、Start Report でなく Recording に設定しておいてください。

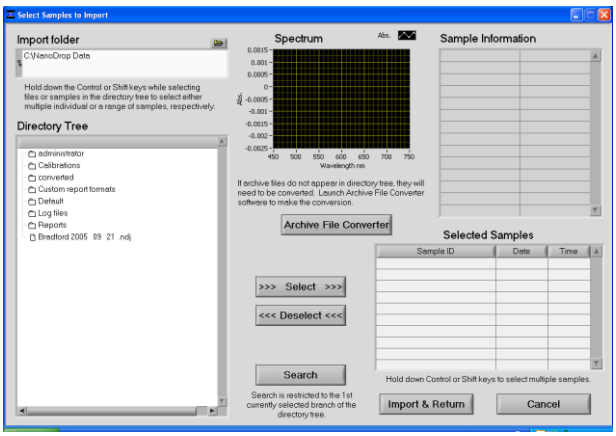
ツールバーの機能はすべてのページに共通です。

- **File:** 本機能に含まれるオプションは 'File Page set-up'、'Print Window' および 'Save Window' です。
- **Configuration:** 本機能に含まれるオプションは 'Auto Scale'、'Include graph in printout'、'Include standards in printout' です。
- **Data:** 本機能に含まれるオプションは、データのインポート、サンプル名の変更、およびサンプルデータの削除です。注意: すべてのサンプルを削除した後、異なる測定モードのデータをインポートする場合は、一度 Data Viewer を終了してから、再開してください。

- **Report:** 本ツールバーファンクションはレポートに含まれる対象のカラムを選択します。詳細については、本セクション後述の “Report” をご覧ください。
- **Help/Context Help:** 本機能は、メインメニュー、すべてのファンクションモード、およびアプリケーションモードで使用することができます。ヘルプ機能は、”Help” メニューから “Show Context Help (コンテキストヘルプの表示)” を選択するか、または ”Ctrl + H” を選択すると開きます。いったん開くと、画面の要素上にカーソルを置くことで、その要素の説明が自動的に出てきます。Context Help はユーザーが選択を解除するまで、動作を続けます。

Import

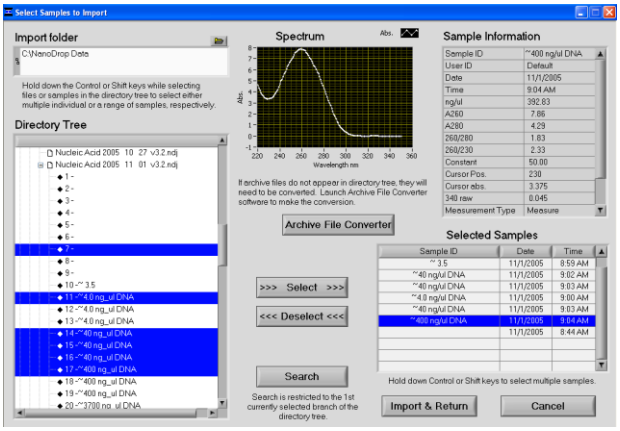
表示するサンプルをインポートするには、Data Viewer ソフトウェアの Plot もしくは Report ページの Data メニューから、”Import Samples” を選択してください。Import Folder ボックスと Directory Tree を含む下記の新しい画面が開かれます。



機能:

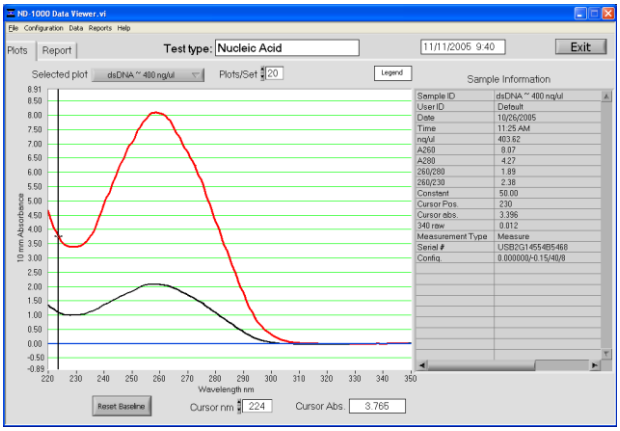
- **Import folder:** インポートするデータを含むフォルダを選択するのに使用します。フォルダの選択はユーザーレベルもしくはより高い階層で行います。ボックス内の各ユーザーフォルダに含まれるアプリケーションもしくはメソッドフォルダーの選択をする必要はありません。
- **Directory Tree:** インポートするデータを選択します。各ファイル名の左側の四角形をクリックすると、各フォルダの詳細が示されます。ファイル内の各サンプル、もしくはファイル全体を選択してください。インポートの選択は、すべて同じアプリケーション、もしくは同じメソッドのファイルにしてください。注意: Hi Abs データは Data Viewer にインポートすることができませんが、Excel 等の表計算ソフトで開くことができます。
- **Archive File Converter:** オペレーティングソフトウェアの初期版で作成された ND-1000 のデータは C:\nanodrop に保存されていません。そのため、データをコピーし、3.7 版と互換性のある .ndj ファイルに変換する必要があります。詳細については、後述の “Archive File Converter” をご覧ください。注意: オリジナルの保存データは本プロセスによって、変換されることはありません。
- **>>> もしくは <<<:** “Selected Samples” に、もしくは ”Selected Samples” から、ハイライトされたサンプルを移動させます。注意: ソフトウェアのデフォルトバッファ容量は 200 サンプルです。
- **Search:** 本ファンクションにより、サンプル ID 名を検索して、特定のデータの位置を突き止めることができます。注意: 本ファンクションを利用する場合は、大文字・小文字の違いを正確に入力してください。
- **Sample Information and Spectrum:** ハイライトされているサンプルに関連する情報とともに移植されます。

- **Import and Return:** 選択されたサンプルデータを Plots もしくは Report 画面に移植します。注意: シフトまたはコントロール PC ファンクションを使って、複数のサンプルを選択しインポートすることが可能です (下図を参照)。また同様に複数のサンプルの選択を解除することも可能です。



Plots

Plots ページには選択したサンプルのスペクトルが表示されます。



機能:

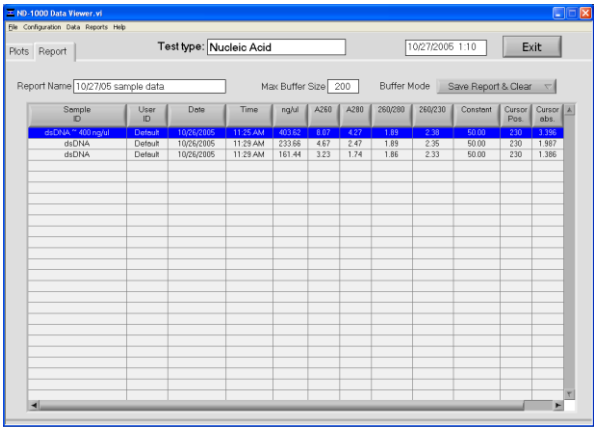
- **Test Type:** 自動的に測定モード名が入力されます。
- **Date:** レポート日時が自動的に入力されます。
- **Selected Plot:** 個別のサンプルデータを選択、もしくはハイライトするには、2 通りの方法があります。対象のプロットへカーソルを合わせてクリックする、もしくは 'Selected Plot' ドロップダウンボックス (Legend も表示されます。) を使用することで選択することができます。選択したサンプルは太いプロット線で表示されます。
- **Plots/Sets:** 1 ページに付き 20 プロットまで図示することができます。レポートは 200 サンプルまで保持できますが、グラフページの容量は 20 プロット/ページなので、追加のサンプルスペクトルは新しいページに表示されます。各ページは 1 セットとして扱われます。
- **Legend:** Legend ボックスにカーソルを合わせると、プロット色に対応したサンプル名が表示されます。Legend からサンプルを選択もしくはハイライトすることはできません。
- **Sample Information:** 選択されたサンプルのデータと共に移植されます。表示データは選択したデータのタイプに対応します。注意: Sample Information はサンプル測定時に取得したデータに

基づき、現行表示されている Data Viewer でのカーソルポジションの変更によって調整されるものではありません。

- **移動式 x 軸および y 軸:** すべてのデータタイプで使用できます。x、y 軸のいずれかでカーソルが表示されなくなる場合、数値を入力すると、各軸を製図し直します。ページの下段に表示される Cursor RFU の数値は移動式カーソルのポジションにより、決定されます。移動式の x 軸は y ポジションのピークを算出するベースラインを決定します。'Reset Baseline' は x 軸を 0 に再配置します。

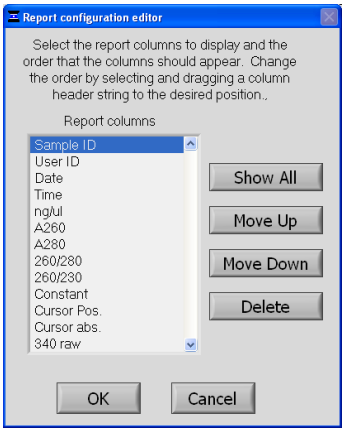
Report

Report ページでは選択したサンプルのデータが表形式で表示されます。各測定モードの column 構成の編集、および多様にカスタマイズされたフォーマットの保存が可能です。



Report ページで使用可能なキーオプションの一部は、ツールバーのドロップダウンメニューよりアクセスすることができます。

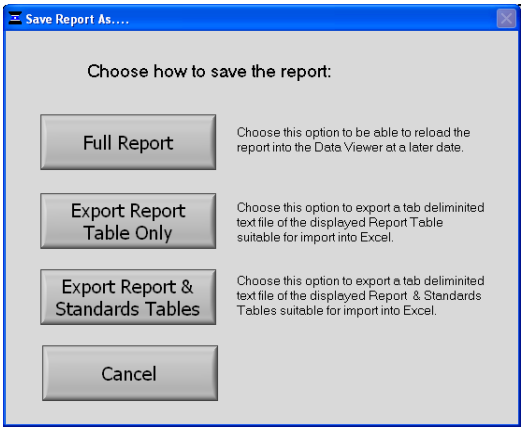
'Configure Report' オプションを選択すると、以下のボックスが表示されます。
Move Up/Down ボタンで順番を入れ替えたり、不要なカラムは Delete ボタンで表示しないようにできます。



編集後、'OK' を選択すると、対象の行のみを表示した Report ページに戻ります。

機能:

- **Sort:** 行によってデータを並び替えます (例: サンプル名順もしくは日付順にデータを並び替える。)。昇順、降順どちらも可能です。
- **Save Report Format:** 現行のレポートフォーマットを .ndf ファイルとして保存します。保存したデータフォーマットをデフォルトとして指定するには、メインメニューに戻り、'User Preferences' を選択し、'Reports' をクリックしてください。'Select Default Report Format' を使用して、保存ファイルのリストから特定のメソッドタイプに使用するフォーマットを指定してください。
- **Load Report Format:** データのインポート前もしくは後に保存したレポートフォーマットがロードされるようにします。
- **Print Report:** ページのみをプリントアウトします。ツールバーの Configuration ドロップダウンからオプションを選択することにより、Standards もしくは Plots ページを印刷するか否かを選ぶことができます。
- **Save Report および Load Report:** 以下のウィンドウに見られるように、数種類のオプションがあります。


Save Report As....
Choose how to save the report:
Full Report
Choose this option to be able to reload the report into the Data Viewer at a later date.
Export Report Table Only
Choose this option to export a tab deliminited text file of the displayed Report Table suitable for import into Excel.
Export Report & Standards Tables
Choose this option to export a tab deliminited text file of the displayed Report & Standards Tables suitable for import into Excel.
Cancel

Full Report オプションを使用すると、Data Viewer は最新の日付のレポートをリロードします。保存したレポートはプルダウンの Load Report を使用することで呼び出すことができます。Load Report 機能を使用すると、レポートはデフォルトの行構成で表示されます。注意: メインメニューの User Preferences モードにアクセスすると、任意のデフォルトコンフィギュレーションを修正および保存できます。レポートは .ndv フォーマットで保存されます。

残りの 2 つのオプションは、Excel 等の表計算ソフトウェアで表示する レポートを対象としています。表計算形式のレポートを開くには *C: \NanoDrop Data \Reports* フォルダにアクセスし、対象のファイル上で右クリックをしてください。

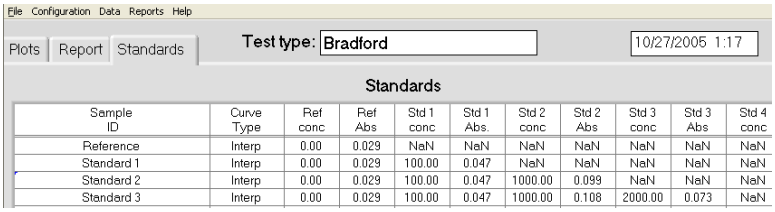
Report ページのその他の機能:

- **Test Type:** データの測定モードは自動的に入力されます。
- **Date:** レポートの作成日時が自動的に入力されます。
- **Report Name:** ユーザーの決定したレポートの名前です。
- **Report Full mode:** レポートを管理するオプションのドロップダウンボックスです。'Ignore'、'Save'、'Print'、および 'Save and Print' の 4 つのオプションで構成されています。'Max Report Size' で設定した数値にレポート数が達すると、選択したアクションが実行されます。

- **Max Report Size:** デフォルトでは、200 に設定されています。注意: Report Full Mode で 'Ignore' に設定されている場合、本機能は使用できません。

Standards ページ

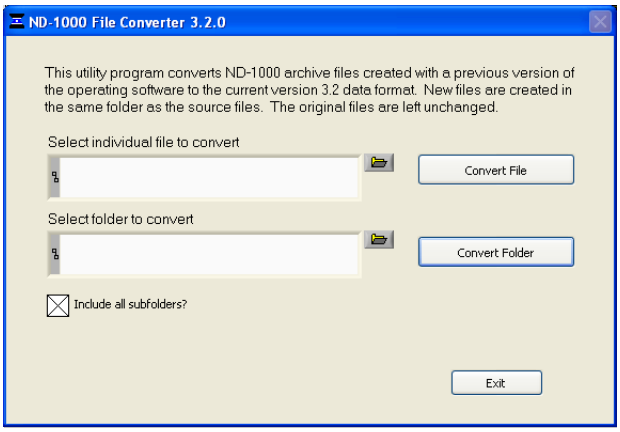
Standards ページでは、各サンプルの測定時に使用された実際の検量線が表示されます。注意: 本ページは検量線を使用した測定モードでのみ使用することができます。



Sample ID	Curve Type	Ref conc	Ref Abs	Std 1 conc	Std 1 Abs	Std 2 conc	Std 2 Abs	Std 3 conc	Std 3 Abs	Std 4 conc
Reference	Interp	0.00	0.029	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
Standard 1	Interp	0.00	0.029	100.00	0.047	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
Standard 2	Interp	0.00	0.029	100.00	0.047	1000.00	0.099	NaN	NaN	NaN
Standard 3	Interp	0.00	0.029	100.00	0.047	1000.00	0.108	2000.00	0.073	NaN

Archive File Converter

c:\NanoDrop Data フォルダ内の保存ファイルのうち、初期版の NanoDrop ソフトウェアで作成されたすべての保存ファイルは、ソフトウェアの最初の使用時に自動的にコピーされ、3.2 版と互換性のある .ndj ファイルに変換されます。ソフトウェアの初期版で作成された保存ファイルで c:\NanoDrop Data に置かれていないものは、Data Viewer での編集の前に、マニュアルで変換する必要があります。Import Data ページから File Converter にアクセスすると、一度に 1 つのファイルもしくは、一度にフォルダ全体を変換することができます。注意: オリジナルの保存ファイルが、本プロセスによって変換されることはありません。


ND-1000 File Converter 3.2.0
This utility program converts ND-1000 archive files created with a previous version of the operating software to the current version 3.2 data format. New files are created in the same folder as the source files. The original files are left unchanged.
Select individual file to convert
Convert File
Select folder to convert
Convert Folder
Include all subfolders?
Exit

表計算プログラムで保存ファイルを開く

保存ファイルは Tab-Delimited ファーマットなので Microsoft Excel や同様の表計算プログラムで開くことができます。Excel で開く場合、データに変更を加える前にファイルに名前を付けて保存してください。.ndj ファイルのデータに変更が加えられると、Data Viewer モードでのデータの認識およびインポートができなくなる場合があります。

16. お問い合わせ先

国内輸入元

株式会社 スクラム
〒130-0021
東京都墨田区緑 3-9-2 川越 ビル

TEL: (03) 5625-9711　Fax: (03) 3634-6333
E-mail: webmaster@scrum-net.co.jp
ウェブサイト: www.srum-net.co.jp

製造元

Thermo Fisher Scientific

3411 Silverside Road
Bancroft Building, Suite 100
Wilmington, DE 19810 U.S.A.

TEL: +1-302-479-7707　Fax: +1-302-792-7155
E-mail: info@nanodrop.com
ウェブサイト: www.nanodrop.com

お問い合わせ

販売元

株式会社スクラム

本社　〒130-0021 東京都墨田区緑3-9-2 川越ビル
Tel. (03)5625-9711 Fax. (03)3634-6333
大阪営業所　〒532-0003 大阪市淀川区宮原5-1-3 新大阪生島ビル403
Tel. (06)6394-1300 Fax. (06)6394-8851
E-mail webmaster@scrum-net.co.jp
Internet www.scrum-net.co.jp

NDT150220